

中華醫事科技大學生物醫學研究所

碩士論文

Chalcone 抑制人類膀胱癌細胞侵襲及移動之機制探討

Study of the inhibitory effect and mechanism of chalcone on human bladder cancer cells invasion and migration

研 究 生：李建輝 (Chien-Hui Lee)

學 號：A00030016

指導教授：施元薇 (Yuan-Wei Shih)

中華民國 一百零二 年 七 月

中文摘要

Chalcone 是由明日葉所萃取出來的類黃酮抗氧化物，具有抗菌、抗發炎的功效，近來有研究指出 chalcone 已被應用於抗癌的研究。本篇研究主要探討 chalcone 是否可以有效地抑制人類膀胱癌細胞的轉移及侵襲能力，進一步探討相關的分子作用機制。在體外實驗中，為了要觀察 chalcone 對於癌細胞轉移能力的影響。我們選取了一株俱有高度轉移能力的人類膀胱癌 T24 細胞，分別處理不同濃度的 chalcone 來探討此藥物對於癌細胞移動性及侵入能的影響。首先利用 wound healing assay 及 Boyden chamber assay，我們發現 chalcone 可以抑制 T24 膀胱癌細胞的移動性及侵入性，在 gelatin zymography、casein-plasminogen zymography 和 polymerase chain reaction 中也發現 chalcone 可以抑制 T24 細胞中 MMP-2、MMP-9 及 u-PA 的活性及 messenger RNA 的表現。為了進一步探求 chalcone 抑制 T24 細胞侵入的機轉，利用西方墨點法，我們發現訊息傳遞途徑中的 FAK、ERK1/2、p38、JNK1/2 和 Akt 的磷酸化表現皆會受到 chalcone 所抑制。然而這些蛋白的活化是否調控著 T24 細胞的侵襲能力，透過專一性抑制劑：U0126、SB203580、SP600125 及 LY294002 幫助我們釐清了 ERK1/2、p38、JNK1/2 及 PI3K 路徑可以調控 T24 細胞 MMP-2、MMP-9 及 u-PA 的表現。另外在實驗中也證實 small GTPase family，如：Ras、Rac-1、Cdc42、RhoA、RhoB 的蛋白表現量也會受到 chalcone 所抑制。此外，核蛋白中 NF- κ B、c-Fos、c-Jun 的表現皆會受到 chalcone 所抑制。綜合上述所有的實驗結果，chalcone 可能是透過 FAK/MAPK 和 FAK/PI3K/Akt signal pathway 來影響下游的轉錄因子 NF- κ B 的活性，進而影響分泌 MMP-2、MMP-9 及 u-PA，最後抑制 T24

細胞的侵襲及移動。



Abstract

Chalcone is a flavonoid antioxidant extracted from *Angelica keiskei* koidzumi. It has various effect such as antibacterial and anti-inflammatory activities. In recent studies, chalcone has shown its anti-cancer property. The purpose of this study is to investigate the inhibitory effect and mechanism of chalcone on human bladder cancer cells metastasis in vitro. We chosed a highly metastastic human bladder T24 cancer cell line which was treated with various concentrations of chalcone to investigate the potential of inhibiting cancer cell migration and invasion. First, we found that chalcone inhibited T24 cells migration and invasion via wound healing assay and Boyden chamber assay. MMP-2, MMP-9, u-PA activity and messenger RNA level were also inhibited by chalcone via gelatin zymography, casein-plasminogen zymography and polymerase chain reaction. In the signal transduction pathway, we found that the phosphorylation of the FAK, ERK1/2, p38, JNK1/2 and Akt were inhibited by chalcone via Western blotting. To verify the activation of above proteins whether regulated T24 metastatic ability, we used specific inhibitors : U0126, SB203580, SP600125 and LY294002 to clarified that the signal transduction of FAK, ERK1/2, p38, JNK1/2 and PI3K/Akt regulated MMP-2 , MMP-9 and u-PA expression. On the other hand, chalcone inhibited the protein level of Ras, Rac-1, Cdc42, RhoA and RhoB with concurrent reduction in the expression level of NF- κ B, c-Fos and c-Jun. In the present study, we demonstrated that chalcone inhibited T24 cells might be through the FAK/MAPK and FAK/PI3K/Akt signal

pathways and exerted inhibitory effect on the expression of NF- κ B transcription factor, MMP-2, MMP-9 and u-PA, afterward inhibited migration and invasion in T24 human bladder cancer cell. This study suggests a possible role of chalcone in bladder cancer therapy.



縮寫表

1. AP-1 : activation protein-1
2. APS : ammonium persulphate
3. DMEM : Dubecco's modified eagle's medium
4. DMSO : dimethyl sulfoxide
5. DNA : deoxyribonucleic acid
6. ECM : extracellular matrix
7. EMSA : electrophoretic mobility shift assay
8. EMT : epithelial-mesenchymal transition
9. ERK : extracellular signaling-regulated kinase
10. EtBr : ethidium bromide
11. FAK : focal adhesion kinase
12. FBS : fetal bovine serum
13. HRP : horse radish peroxidase
14. JNK : c-Jun N-terminal kinase
15. kDa : kilo-dalton
16. MAPK : mitogen-activated protein kinase
17. MMPs : matrix metalloproteinases
18. mRNA : messenger RNA
19. MT-MMPs : membrane-type matrix metalloproteinases
20. MTT : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
21. NC membrane : nitrocellulose membrane

- 22. NF- κ B : nuclear factor kappa B
- 23. PAGE : polyacrylamide gel electrophoresis
- 24. PAI : plasminogen activator inhibitor
- 25. PARP : poly ADP-ribose polymerase
- 26. PBS : phosphate buffered saline
- 27. PI-3K : phosphoinositide 3-kinase
- 28. PSA : penicillin / streptomycin / amphotericin
- 29. RT-PCR : reverse transcription-polymerase chain reaction
- 30. SDS : sodium dodecyl sulfate
- 31. TBE : Tris-borate-EDTA
- 32. TEMED : N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
- 33. TIMPs : tissue inhibitor of matrix metalloproteinase
- 34. t-PA : tissue type plasminogen activator
- 35. Tris : hydroxymethyl-aminomethane
- 36. u-PA : urokinase-plasminogen activator
- 37. u-PAR : urokinase-plasminogen activator receptor

致謝

時光飛逝，經過兩年的研究所洗禮讓我的身心靈皆得到豐富的成長，感謝神一路上的看顧與保守。

首先要誠摯感謝我實驗的啟蒙恩師-施元薇 老師兩年來在實驗上對學生的細心教導，使學生在實驗中習得許多寶貴的知識與經驗，讓學生論文得以順利完成，並且感謝施老師平日對學生的關懷及待人處事上的教導，使學生在各方面都獲益良多，在此致上最誠心的敬意和謝忱。

本論文的完成亦得感謝本校殷立德 老師以及嘉南藥理科技大學陳品晟老師，在百忙之中撥冗審閱並詳加簽正，給予許多寶貴的建議，使得學生論文能夠更臻完善。

兩年來的實驗室生活中，兩任研究助理雅珊及芳汝，感謝你們為實驗室帶來許多美好的回憶，感謝小胖無怨無悔跑腿買便當，感謝學弟妹伊婷、月鳳、哲均、三順及怡君為實驗室帶來歡樂，感謝承愷醫師帶來的手工麵包，感謝辰興及博智二位學長的陪伴讓研究生生活變得絢麗多彩。

在繁忙的課業中，昌嶧、品君、祈佑、鈞緯、孟庭、怡君、筑琪及雅馨，感謝有大家的參與得以讓班上的各項事務順利推動，恭喜我們順利走過這兩年。感謝班導師楊堉麟 學務長盡心盡力關心班上每一位同學。

要感謝的師長及朋友實在太多，無法一一贅述，也無法用文字表達我心中對您們的感激，在此致上十二萬分的謝意。

最後要感謝神賜給我一個很好的家庭，讓我可以無後顧之憂專心的求學。特別要感謝我的父親及母親一直在背後支持我，也要感謝姐姐們默默地為我加油打氣，更要感謝爺爺奶奶帶給我美好的信仰，讓我帶著滿滿的學識

順利完成學業。



李建輝 謹致於

中華醫事科技大學生物醫學研究所

中華民國一百零二年七月

目錄

中文摘要.....	i
Abstract.....	iii
縮寫表.....	v
致謝.....	vii
目錄.....	ix
圖表目錄.....	xi
第一章 文獻資料回顧	
第一節 膀胱癌.....	-1-
第二節 癌細胞的入侵與轉移.....	-4-
第三節 癌細胞入侵與轉移之相關因子.....	-6-
第四節 細胞外基質的組成與分類.....	-15-
第五節 Chalcone 的背景介紹.....	-16-
第二章 研究動機.....	-18-
第三章 研究架構.....	-19-
第四章 實驗材料及方法	
第一節 實驗材料及實驗設備.....	-20-
第二節 實驗方法.....	-27-
第五章 實驗結果.....	-35-
第六章 討論.....	-40-
第七章 結論.....	-45-
第八章 參考文獻.....	-46-

第九章 圖表與圖表說明.....	-63-
第十章 附圖表.....	-79-



圖表目錄

Figure 1. Effect of chalcone on the viability of T24 cell.	-63-
Figure 2. Effect of chalcone on the migration of T24 cells.	-64-
Figure 3. Effect of chalcone on invasion of T24 cells.	-66-
Figure 4. Effect of chalcone on secreted MMP-2/MMP-9 and u-PA.	-68-
Figure 5. Effect of chalcone on T24 MMP-2, MMP-9 and u-PA expression.	-69-
Figure 6. Effect of chalcone on MMP-2, MMP-9 and u-PA mRNA expressions in T24 cells.	-70-
Figure 7. Effects of chalcone on the phosphorylation of FAK, ERK, p38, JNK, Akt and PI3K.	-71-
Figure 8. Effects of ERK inhibitor (U0126) and chalcone on MMP-2/MMP-9 and u-PA secretion.	-72-
Figure 9. Effects of p38 inhibitor (SB230580) and chalcone on MMP-2/MMP-9 and u-PA secretion.	-73-
Figure 10. Effects of JNK inhibitor (SP600125) and chalcone on MMP-2/MMP-9 and u-PA secretion.	-74-
Figure 11. Effects of PI3K inhibitor (LY294002) and chalcone on MMP-2/ MMP-9 and u-PA secretion.	-75-
Figure 12. Effects of chalcone on the protein expression level of small GTPases family.	-76-
Figure 13. Effects of chalcone on T24 NF- κ B, c-Fos and c-Jun expression.	-77-
Figure 14. Effects of chalcone on the protein expression level of NF- κ B, c-Fos	

and c-Jun expression.-78-



第一章 文獻資料回顧

第一節 膀胱癌

近年來台灣的癌症發生率年年上升，根據行政院衛生署統計資料顯示，自民國 75 年至今，惡性腫瘤一直是台灣國人十大死因之首，平均每 13 分 30 秒就有 1 人死於癌症，故癌症堪稱為國人頭號殺手。

膀胱癌在最近 10 年內一直是台灣男性十五大癌症之一，也是台灣最常見的泌尿系統癌症。膀胱癌泛指各種出自膀胱的惡性腫瘤，也就是有異常細胞大量增殖而不受管制。膀胱是貯存尿液的中空器官，主要由肌肉構成，位於下腹部，其內部接觸尿液的表面覆有一層防水的過渡性上皮細胞組織，最常見的膀胱癌大多源自於這一層過渡性的上皮細胞，稱為膀胱過渡性上皮細胞癌(Transitional cell carcinoma of urinary bladder) 或稱為膀胱泌尿上皮細胞癌(Urothelial cell carcinoma of urinary bladder)。

從流行病學的研究結果來看，膀胱癌是一種和環境致癌物質密切相關的癌症。在台灣的膀胱癌的發生率，發現在雲嘉南的烏腳病流行區域內最高，由此可見環境危害對於膀胱癌的影響非常顯著（許、陳，1999）。

膀胱癌好發於 60 歲以上的男性，對於造成膀胱癌的真正原因，目前尚未明瞭，但主要與下列因素有關：

1. 抽菸：平均而言，有抽菸的人，其發生膀胱癌的機率比沒有抽菸的人高了一倍，而且抽菸的時間愈長以及抽菸的量愈多，則好發的機率愈大，因為香菸的煙霧中有許多種已知可引發動物膀胱癌的致癌物質。

2. 芳香胺類：與膀胱癌最有關係的化學致癌物質，存在於某些化學染料中。

某些職業如：橡膠、化學製劑、皮革製造業、美髮師、金屬加工業、印刷

工人、油漆工人、紡織工人以及卡車司機，因長時間接觸了二奈胺或聯苯，其好發膀胱癌的機率上升。

3. 止痛劑的使用：研究發現服用含有乙醯氧乙苯之止痛劑的人，其發生膀胱癌的機率相較於未服用的人多 4 倍。常用的止痛劑如阿斯匹靈及普拿疼，長期使用後也會造成較高的膀胱癌發生率。
4. 居住環境：在烏腳病盛行地區有較高的膀胱癌罹患率，這和飲用含有砷的井水有關。
5. 飲食習慣：常吃醃漬、發酵、碳烤等食物。此外，過去曾罹患膀胱癌或是患有反覆的膀胱炎、膀胱結石以及血吸蟲感染等，也是重要的致病因子。

膀胱癌最常見的警示症狀是血尿，它與結石病患最大的不同是在於它是無痛性的血尿，初期的出血是間歇性的，依出血程度的不同，尿液的顏色會呈現淺褐色至深紅色的變化，有時會合併有血塊的排出，頻尿及解尿疼痛也是可能的症狀。當膀胱癌晚期，可能有尿路阻塞，腸阻塞，恥骨上方疼痛，下肢水腫等症狀 (deKernion *et al.* , 1985)。

醫師根據膀胱癌患者的檢查結果，判斷腫瘤的大小、位置、多發性及擴散的情形將膀胱癌作分期。分期是決定如何治療膀胱癌的重要依據 (Zaak, 2003)。

第 0 期：通常稱為表淺性膀胱癌，癌細胞只局限在膀胱黏膜層，尚未侵犯至膀胱壁肌肉組織層。

第 I 期：癌細胞侵犯至黏膜下層，尚未侵犯至膀胱壁肌肉組織，癌細胞並未擴散至膀胱附近的淋巴結，也未擴散至其他器官，此時還稱表淺性膀胱癌。

第 II 期：癌細胞侵犯至膀胱壁肌肉層，但未深入膀胱周圍的脂肪層，此

時癌細胞並未擴散至膀胱附近的淋巴結，也未擴散至其他器官。

第 III 期：癌細胞侵犯至膀胱壁肌肉層，進入膀胱周圍的脂肪層，並可能

擴散至附近的器官（女性病患的陰道及子宮，男性病患的前列腺），但並未擴散至淋巴結。

第 IV 期：癌細胞深入膀胱壁各層並擴散至腹腔，此時癌細胞以擴散至附

近之淋巴結及遠端的器官，例如骨骼、肺部等器官。

治療膀胱癌會依照癌細胞的類型、分期、年齡和病人的整體健康情形而定。目前治療膀胱癌的方式包括：

1. 外科手術：表淺性的手術，包括第 0 期及第 I 期通常是利用膀胱鏡來進行經尿道膀胱腫瘤切除術；如此不僅可將腫瘤切除，也可做為診斷癌症侵犯膀胱壁深度之用。但若是膀胱癌已經侵犯至膀胱壁時，此時稱為侵犯性膀胱癌；是無法使用經尿道膀胱腫瘤切除術將膀胱切除乾淨，而是要使用根治性膀胱切除術，將膀胱及其周圍的器官，包括淋巴結及生殖器官完全切除，所以手術後可能造成不孕及無法性交的問題。手術後再以迴腸、大腸或胃做膀胱重建手術，再由病患原來的尿道或是在病患腹部做一個人工膀胱的造瘻口，以利日後排尿 (May *et al.*, 2013)。
2. 生物療法：又稱免疫治療，是利用病患本身的自然防禦能力去殺死癌細胞。卡介苗 (BCG) 可用於早期或表淺型的膀胱癌，可增加免疫系統中正常免疫細胞的數量，以破壞膀胱癌細胞 (Yamamoto *et al.*, 1990)。
3. 化學治療：當膀胱癌細胞已經侵犯至深層部位或有轉移的情況發生，無法以手術方式將腫瘤完全切除乾淨時，或病患整體健康無法承受手術的治療

時，可用全身性的化學療法進行治療，抗癌藥物會經由全身的血液循環而作用到全身的癌細胞。化學治療可以直接將藥物注入膀胱內（體腔內治療），或經由靜脈注射給予作用至全身的癌細胞（deKernion, 1977）。

4. 放射線治療：大多用於身體健康情況不適合手術或拒絕手術治療的病患。放射線治療是使用高穿透能力的 X 射線來破壞癌細胞，單獨的放射線治療不容易根除病情，最好合併手術切除或化學治療（Pointon, 1973）。

第二節 癌細胞的入侵與轉移

人體的某些細胞有時受到物理性或化學性的刺激後，會失去正常的生理控制機轉而快速的生長，形成腫瘤。這些異常增生（proliferation）的細胞，成為不受身體控制的集團，它們無限的生長，最終影響到人體的功能。腫瘤可能發生在身體上的任何器官，它可能為良性也可能是惡性，即便良性腫瘤也可能危及性命，例如長在腦部的良性腫瘤、長在心房的良性粘液瘤。

其中良性腫瘤和惡性腫瘤之間的差別，主要是和癌細胞的細胞核分裂像以及對周遭組織細胞之侵犯（invasion）與遠部組織之轉移能力（metastasis）有關，也就是說癌細胞的增生速度愈快愈容易侵犯周圍組織器官，並且具有轉移至遠端器官能力的癌細胞，稱之為『惡性腫瘤』，其主要以浸潤方式生長，並可藉助淋巴管、血管及腔道，使癌細胞轉移到人體其他組織器官，在臨床上可藉由組織病理切片檢查及評估相關器官之侵犯加以判定和分類。

癌細胞的侵襲與轉移往往是癌症病患病灶復發致死並導致癒後不良的主要原因。當癌細胞僅生長在發病的局部位置，稱為原位癌，若可以在此階段偵測到癌細胞並且進行治療，則治癒的成功比例最高。而當癌細胞透過血液、

淋巴管等方式轉移到人體其他組織器官生長成續發性惡性腫瘤時，稱為異位癌 (Steeg, 2003)，若在此時才檢查到癌細胞，則利用手術或其它方式來治療的成功機率就大大降低，而癌症轉移的現象大都出現在末期，也因如此所以增加了癌症治療的困難度。雖然近年來已經知道腫瘤形成的機制，以及瞭解臨床上腫瘤轉移的重要性，但是對於腫瘤轉移的過程仍然不清楚 (Bernards and Weinberg, 2002；Hynes, 2003)。一般而言，腫瘤細胞轉移及擴散的過程中經常伴隨著癌細胞與其週邊組織的狀態改變 (Anderberg *et al.*, 2009)，其中包括【1】細胞與細胞外基質 (extracellular matrix, ECM) 之間的結合能力 (adhesion) 改變，細胞與細胞間的相互作用力破壞；【2】細胞的侵襲及移動 (motility) 能力上升；【3】細胞骨架的重整；【4】細胞外基質的分解，接著癌細胞會分泌大量的蛋白酶 (proteinase) 幫助其穿過細胞外基質；【5】侵入到循環系統中的血管或淋巴管，經由逃避免疫系統的防護，最後貼附在內皮細胞上，穿破血管或淋巴管到達新的組織器官；【6】再經由大量的增生 (proliferation) 及；【7】血管新生 (angiogenesis) 作用。癌細胞便藉由奪取正常組織器官的養分而造成正常組織器官功能的耗弱，最後造成癌症病人的死亡 (Kim *et al.*, 2001)。

以上皮細胞為例，細胞癌化至轉移侵入的過程（附圖一）：正常的表皮細胞受到物理性或化學性的刺激後，轉型成癌細胞，轉型後的癌細胞便開始大量的增生，增生後的癌細胞會分泌蛋白水解酵素，將基底膜及細胞間基質給分解，而透過入侵循環系統中的血管或淋巴管，緊接著貼附在內皮細胞上，穿過血管或淋巴管到達一個適合它生長的地方，之後癌細胞再經由不正常的大量增生促進血管的新生成，最後癌細胞透過新生成的血管，吸收周邊正常

組織的養分，導致正常的組織器官功能受到影響，造成癌症病患的死亡。

當癌細胞進行轉移擴散時，會藉由分泌蛋白質水解酵素來分解細胞外基質，接著穿透基底膜使癌細胞具有移動性 (Flug and Kopf, 1995)。而與胞外基質分解有關的酵素，包括：serine proteinase、matrix metalloproteinases (MMPs)、cathepsins、plasminogen activator (PA) (Tryggvason *et al.*, 1993)，其中 MMP-9、MMP-2 及 u-PA 在基底膜的破壞扮演著重要的角色，且與癌症的侵襲及轉移最有關係 (Hao *et al.*, 2007; He *et al.*, 2007)。惡性腫瘤細胞本身會分泌 MMPs，在癌症末期時某些 MMPs 的表現也會相對的上升，而 MMPs 具有蛋白分解活性可分解膠原蛋白，在腫瘤破裂的基底膜處可測得大量的 MMPs，目前已證實是用來作為局部侵襲和遠處轉移，主要在於助長癌細胞穿透基底膜，由血管滲入組織而達成轉移之目的 (Nabeshima *et al.*, 2002)。

第三節 癌細胞入侵與轉移之相關因子

1. 基質金屬蛋白酶 (matrix metalloproteinases ; MMPs)

基質金屬蛋白水解酵素 (MMPs) 是一群擁有水解蛋白質能力的酵素 (Nagase *et al.*, 1999)，在細胞外基質分解中扮演著重要的角色，其在正常的生理功能中扮演：組織的修復、器官的形成、胚胎的植入、神經的生長、子宮頸的擴張、傷口的愈合、血管的新生成以及細胞凋亡等角色；在病理上則是和組織的纖維化、心血管疾病以及癌細胞的轉移擴散 (Hussaini *et al.*, 2007) 等息息相關。基質金屬水解蛋白酶家族中的 MMP-2 (gelatinases A) 與 MMP-9 (gelatinases B) 具有水解 type IV collagen 基底膜的能力

(Westermarck and Kahari, 1999)，並且被豐富的表現在許多的惡性腫瘤中 (Johnsen *et al.*, 1998)，所以從文獻中可以發現 MMP-2 與 MMP-9 的表現與癌細胞的轉移和侵入具有高度相關性 (Hao *et al.*, 2007; He *et al.*, 2007; Liabakk *et al.*, 1996)。

【1-1】基質金屬蛋白水解酵素之分類

就目前所知道的基質金屬蛋白水解酵素家族，依其特性主要分為五大類：

第一大類主要以 collagenase 為主

包括 interstitial collagenase (MMP-1)、neutrophil collagenase (MMP-8)、collagenase 3 (MMP-13)及 collagenase 4 (MMP-18)。此類具有在特殊位置切斷 interstitial collagen I、II、III 的能力，形成氨基端 -3/4 與羧基端 -1/4 的氨基酸片段，接著在生理的狀態下就會自然分解(Shapiro, 1998)，或由其他的 MMP 進行進一步的分解，collagenases 也可分解一些其他 ECM 以及非 ECM 分子。

第二大類以 gelatinase 為主

包括 gelatinase A (MMP-2) 和 gelatinase B (MMP-9)。可與 gelatin、collagen、laminin 結合。MMP-2 也會分解第一型的膠原蛋白，還會活化 pro-MMP-9 (Murphy, 1997)。

第三大類以 stromelysin 為主

包括 stromelysin-1、procollagen (MMP-3)、stromelysin-2 (MMP-10)及 stromelysin-3 (MMP-11)。其中 MMP-3 分解效率較高，除了分解細胞外基質以外，MMP-3 還可以活化一些 pro-MMP，尤其對 MMP-1 的活化非常重

要。

第四大類以 Matrilysin 為主

包括 MMP-7 及 MMP-26 屬於此類。其特徵在於結構缺乏 hemopexin。除了分解細胞外基質以外，MMP-7 還可以分解一些細胞膜表面分子。

第五大類以 membrane-type MMPs 為主

此類 MMP 位於細胞膜上，包括 type 1 transmembrane protein (MMP-14、MMP-15、MMP-16、MMP-24) 和 glycosylphosphatidylinositol anchored protein (MMP-17、MMP-25)。其中 MMP-14 具有分解 type I、II、III collagen 的能力，並且在血管新生作用扮演關鍵的角色 (Ohuchi *et al.*, 1997)。

另外有一些尚未被歸類或是最近才發現包括 macrophage metalloelastase (MMP-12)、rheumatoid arthritis-associated metalloelastase (MMP-19)、enamelysin (MMP-20)、XMMP (Xenopus) (MMP-21)、CMMP (chickem) (MMP-22) 及 MMP-23 (Nagase and Woessner, 1999)。

MMPs 一般為不具活性的形態 (latent pro-form)，必須透過位於活性中心的 Zn^{2+}/Ca^{2+} 來活化，使 MMPs 具有分解細胞外基質的能力，而 MMPs 會以 zymogen (inactive form) 的方式被分泌出來，之後 zymogen 需要藉由一些外來的蛋白水解酵素或是 organomercurials 來活化，活化後的 MMP 之分子量大約會減少 10 kDa，因為 N 端的 propeptide domain 會被切掉，去除其與活性中心之間的交互關係，達成活化的目的；然而 MMPs 的活性可以被內生性的抑制因子 TIMPs (tissue inhibitor of metalloproteinases) 所抑制。

【1-2】基質金屬蛋白水解酵素的表現與調控

基質金屬蛋白水解酵素基因的表現可藉由一些因子的誘導而有所改變，

例如生長因子、細胞激素、化學試劑、甚至物理上的刺激，都可能增加基質金屬蛋白水解酵素的表現，然而，基質金屬蛋白水解酵素的表現會被 TGF- β 、retinoic acids、glucocorticoids 所抑制。

基質金屬蛋白水解酵素的表現受到許多不同的訊息傳遞蛋白以及轉錄因子所調控。先前的研究已經發現在發炎時，轉錄因子 NF- κ B 與 AP-1 會經由調控 cytokine 與 chemokine 轉錄的表現，進而影響基質金屬蛋白水解酵素基因的表現 (Kajanne *et al.*, 2007; Palanki, 2002)。之前對 macrophage 的研究中發現，抑制 NF- κ B 的表現可以降低 MMP-2、MMP-9 的蛋白表現 (Yoshida *et al.*, 2001)。在一些黑色素瘤細胞 (murine melanoma cells) 中，NF- κ B 可藉由活化 MT-MMP 的表現而去活化 pro-MMP-2，增加癌細胞侵入的能力 (Philip *et al.*, 2001)。在單核細胞與骨癌細胞中發現，ET-1 與 AP-1 會調控 MMP-2 與 MMP-9 基因的轉活化，進而影響到 MMP-2 與 MMP-9 的表現 (Aljada *et al.*, 2001; Felix *et al.*, 2006)。在 MAPK 訊息傳遞路徑中，已知當大鼠皮質受到物理性的刮傷時，活化的 p38 與 ERK 的路徑會去調控初代培養的星狀細胞 MMP-9 的表現 (Wang *et al.*, 2002)，肺癌細胞可藉由 ERK/Sp1 這條路徑增加 MMP-2 的表現 (Pan and Hung, 2002)。在 NIH3T3 細胞中，轉殖入活化的 Ras，MEK1 可以增加 MMP-2，MMP-9 的表現 (Welch *et al.*, 2000)。癌細胞可以藉由 PI-3K 路徑去調控 MMP-2 與 MMP-9 的表現及增強細胞侵入的能力 (Kubiatowski *et al.*, 2001)。在 HT1080 細胞中，Akt/PKB 可藉由增加 NF- κ B 的轉錄活性，進而增加 MMP-9 的表現 (Kim *et al.*, 2001)。在老鼠乳房上皮細胞中，Akt 會誘導 MMP-2 的表現，增加細胞 invasion 的能力 (Park *et al.*, 2001)。

【1-3】基質金屬蛋白水解酵素活化機制

基質金屬蛋白水解酵素是屬於分泌型蛋白，以未活化態基質金屬蛋白水解酵素分泌至細胞外 (Nelson *et al.*, 2000)，而在生物體內基質金屬蛋白水解酵素的活化調節可以受到自己催化 (autocatalysis) 或則藉由一些 urokinase plasminogen activator (u-PA) 或 tissue-type plasminogen activator (t-PA) 二者啟動一連串的蛋白水解反應，將 plasminogen 轉變成 plasmin，這些活化的酵素例如：plasmin 或是其它基質金屬蛋白水解酵素將未活化態的基質金屬蛋白水解酵素轉變成活化態的基質金屬蛋白水解酵素 (He *et al.*, 1989; Quemener *et al.*, 2007)。而生物體外可藉由有機汞 (APMA)、HOCl、oxidized glutathione (GSSG) 所活化，活化過程將導致基質金屬蛋白水解酵素的 N 端 propeptide domain 被切除而少了 10 kDa。但是基質金屬蛋白水解酵素的活性易會受到內生性抑制劑 tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) 所抑制，兩者間的平衡取決於細胞外基質的分解與形成 (Nagase, 1997)。

2. Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs)

TIMPs 是基質金屬蛋白水解酵素的內生性抑制劑，它會和活化態的 MMPs 以 1：1 的比例形成非共價鍵的復合物，並且抑制 MMPs 活性中心的鋅離子，使 MMPs 失去分解細胞外基質的功能 (Birkedal-Hansen, 1995)。在正常的生理狀態下，TIMPs 與 MMPs 的平衡是很重要的，一旦失去了平衡，就可能造成許多疾病，如：動脈硬化和細胞轉移等；癌細胞的轉移也是 TIMPs 與 MMPs 之間比例不平衡，造成細胞外基質被分解的原因 (Chambers and Matrisian, 1997)。目前已發現有四種 TIMPs，分別為：

【2-1】TIMP-1

位於 X 染色體 p 區 (Xp23)，分子量大約為 28.5 kDa，是 TIMPs 中最早被發現的，也是被研究最清楚的，已知 TIMP-1 的功能有許多，例如：抑制活化態的基質金屬蛋白水解酵素 (Woessner, 1991) 和未活化的 MMP-9 結合 (Kolkenbrock *et al.*, 1995)、抑制血管新生 (Johnson *et al.*, 1994)、抑制腫瘤的侵襲和轉移 (Alvarez *et al.*, 1990)、在胚胎的形成過程中也扮演著重要的角色 (Flenniken and Williams, 1990)。

【2-2】TIMP-2

位於第 17 對染色體 q 區 (17q23) (De Clerck *et al.*, 1992)，分子量大約為 21kDa，TIMP-2 在 1990 年由 human melanoma cell cDNA library 中所分離出來 (Boone *et al.*, 1990)。TIMP-2 和 TIMP-1 功能相似，特別是在抑制腫瘤的侵襲和轉移中扮演著重要的角色，雖然 TIMP-2 和 TIMP-1 的序列有 66% 的相似度，但在某些時候，因為 TIMP-2 的表達會被修飾，因此在同樣情況下，TIMP-2 和 TIMP-1 的結果往往會有所差異 (Stetler- Stevenson *et al.*, 1990)。

【2-3】TIMP-3

位於第 22 對染色體 q 區 (22q12)，分子量大約為 21 kDa，TIMP-3 是 TIMP family 中唯一位在 membrane 中的，它會和 ECM 結合在一起。TIMP-3 的功能和 TIMP-1、TIMP-2 較不相同，TIMP-3 主要的功能和調節細胞分化及細胞週期有關，甚至可以當成細胞分化結束時的一個指標 (Yang and Hawkes, 1992)。其中有學者指出：在 HL-60 leukemia cells 的分化過程，TIMP-3 的上升和 cell cycle 停留在 G1 phase 有關 (Wick *et al.*, 1994)。

【2-4】TIMP-4

TIMP-4 是在 1996 年時被發現，分子量大約為 22 kDa，目前對 TIMP-4 的了解尚未清楚，只大約了解 TIMP-4 可能有組織特異性，尤其是位在人類的心臟組織 (Greene *et al.*, 1996)。

3. 纖溶酶原激活因子 (Plasminogen activator)

plasminogen activator (PA) 是一群 serine proteinases，和 plasminogen 具有高度的專一性，因此可以將 plasminogen 水解成 plasmin，而被活化的 plasmin 具有蛋白水解酵素的功能，不但可以將血液凝塊中的成分給分解掉，更具有活化其他蛋白水解酵素的功能。PA 中的尿激酶型纖溶酶原激活因子 (urokinase-plasminogen activator, u-PA)，會與 urokinase-plasminogen activator receptor (u-PAR) 結合，促進水解 plasminogen 的活性，進而造成細胞間基質的分解，所以癌細胞會藉由 u-PA 的表現，調控其本身的移動和侵入 (Han *et al.*, 2006; Suthiphongchai *et al.*, 2006)；而組織型纖溶酶原激活物 (tissue-type plasminogen activator; t-PA) 主要存在於血液中，其主要的功能在於藉由活化 plasminogen，來將血液凝塊中的成分給分解，進而防止血栓的形成。

u-PA 與 t-PA 的主要功能皆與 plasminogen 的活化有關，但許多因素造成它們在生理上的意義有所不同。當 t-PA 分泌到胞外後會與 plasminogen、fibrin、及細胞間基質的組成物質相結合，進而發揮蛋白水解酵素的功能，幫助血管內 fibrinolysis 的作用。雖然 u-PA 也是分泌型酵素，但是 u-PA 必須藉由與細胞膜表面接受器 (u-PAR, CD87) 結合，才具有較強的蛋白水解活性，進而造成細胞外基質之物質的分解，因此被認定與癌細胞的侵入與轉移較有關 (Hofmann *et al.*, 1994; Romer *et al.*, 1996)。另外也有文獻指出，在人

類的乳癌細胞 (MDA-MB-231) 中，當 nuclear factor kappa B (NF- κ B) 的轉錄活性增加時，會促進 u-PA 的表達，進而影響癌細胞的侵襲能力 (Sliva *et al.*, 2002)。

4. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 訊息傳遞路徑

Mitogen-activated protein kinase pathway (MAPK) 路徑是傳遞外界訊息到細胞內的重要途徑，在真核細胞的訊息傳遞上扮演關鍵的角色，並參與細胞的生長、分化、凋亡以及轉移等現象 (Chan and Weaver, 1998; Johson and Lapadat, 2002) (附圖三)。在哺乳類動物中，MAPK cascades 的活化，必須經由 MAPK kinase kinase (MAPKKK)、MAPK kinase (MAPKK)、MAP kinase (MAPK) 三個蛋白激酶進行一連串的磷酸化作用 (Chan and Weaver, 1998)。MAPK 家族屬於 serine/ threonine-specific 的蛋白質激酶，主要分為三大類：

(a) extracellular signal-regulated kinases (ERK) pathway

ERK 主要有兩個 isoform：ERK1 (42 kDa) 及 ERK2 (44 kDa)，可經由一些外來的刺激，如：生長因子 (growth factors)、生長激素 (cytokines)、病毒感染、G protein-coupled receptors 和致癌因子等而活化 (Johson and Lapadat, 2002)。ERK1/2 磷酸化的過程是透過活化上游 MAPKKK (A/B/C-Raf) 及 MAPKK (MEK1/2) 而磷酸化。

細胞突變會使得 Ras 轉變為活化態的致癌基因，而讓 ERK1/2 路徑活化，促進癌細胞的增生。因此，利用抑制 ERK1/2 的活化，也是目前進行抗癌藥物開發的重點之一 (Dhanasekaran and Johnson, 2007)。

(b) c-Jun NH2-terminal kinases/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) pathway

包含 JNK1、JNK2 和 JNK3，同樣為受到壓力的刺激而活化的蛋白質激酶 (Kyriakis *et al.*, 1994)。JNK 的磷酸化則透過活化上游的 MAPKKK (ASK1) 及 MAPKK (MKK4、MKK7) 而磷酸化。當熱休克、滲透休克、細胞激素、UV 輻射、氧化壓力和促進發炎因子和 DNA 損害劑出現時，可活化 JNK/SAPK 路徑，與 DNA 結合蛋白 c-Jun 結合並活化，同時促進轉錄因子 activator protein-1 (AP-1) 的表現 (Robinson and cobb, 1997)。有研究發現 JNK 在控制細胞程序性死亡或凋亡中扮演著重要的角色 (Tournier *et al.*, 2000)。

(c) p38 MAPK pathway

p38 分子量為 38 kDa，具有四種 isoform：p38 α 、p38 β 、p38 γ 、p38 δ ，均會受到上游 MAPKKK (DLK)、MAPKK (MKK3 及 MKK6) 的磷酸化而活化。當細胞受到 UV、LPS 及促進發炎因子如：TNF- α 、IL-1 的刺激時，p38/MAPK pathway 就會活化 (Stadherim and Kucera, 1998)。

5. PI3-kinase

PI3-kinase (phosphatidylinositol 3-kinase) 會與 phosphatidylinositol (PI) 及 PI-4,5-biphosphate 上的 inositol 環的 D-3 位置結合而磷酸化；PI3-kinase 分為幾類異構物，第一類由 p110 α 與 p110 β 連接上 p85 再與 receptor tyrosine kinase 結合；第二類包括 68D、cpk 與 p170。p85 包含 2 個 SH₂ 區域及 1 個 SH₃ 區域 (Kapeller *et al.*, 1994)，p85 可當作 p110 的調節者，而 p110 則是連接 PI3-kinase 與 ligand-activated receptor。p85 可分成 p85 α 與 p85 β ，p85 α 與 catalytic subunit 緊密地結合，p85 β 目前功能未知，兩個 isoform 都可與 receptors 結合並活化 receptors，也當作是 tyrosine kinase 的

受質。當細胞受到一些因子刺激時如 (IL-3) 會活化 PI3-kinase (Welham *et al.*, 1994)。

6. Akt/PKB

Akt/PKB 位於細胞內多條訊息傳遞的分叉點，並作為由 growth factor receptor 所活化 phosphatidylinositol 3-kinase (PI-3-kinase) 所起始許多功能的傳遞者；尤其在 insulin 相關的許多代謝反應，Akt/PKB 更是扮演重要的調節角色。另外，Akt/PKB 的活化主要促使細胞生存。最近研究發現 tumor suppressor PTEN 會拮抗 PI-3-kinase 及 Akt/PKB 的活化，顯示了 Akt/PKB 可能是癌症發生的重要因子 (Kandel and Hay, 1999)。最近發現它會抑制 RhoB 的表現以及促進細胞惡化轉移。

7. NF- κ B

NF- κ B 為轉錄因子，且人類 encode MMP-2/MMP-9 基因的 promoter 區域有與 NF- κ B 結合的保留序列。也有研究報告證實活化的 NF- κ B 經 translocate 至細胞核後會誘發 MMP-2/MMP-9 基因表現；而且 NF- κ B 的活化是誘發 MMP-2/MMP-9 mRNA 所必須的 (Peng *et al.*, 2006)。

8. c-Jun/c-Fos

c-Jun/c-Fos 轉錄因子在誘發 neoplastic transformation 及參與細胞增生、分化、發炎有關等基因扮演重要的角色，也被認為和調節 tumor progression、metastasis 有關 (Ding *et al.*, 1999)。

9. GTPase family

在 GTPase 家族的成員中，有 RhoA, RhoB, Ras, Rac-1 及 Cdc42

，一般而言，屬於 GTPase 的蛋白會促進細胞感染 (invasion)、轉移 (metastasis)、癌化 (oncogenesis) (Khosravi *et al.*, 1995 ; Pruitt and Der, 2001 ; Westwick *et al.*, 1997 ; Whitehead *et al.*, 1998)。

第四節 細胞外基質的組成與分類

細胞外基質主要分為兩種：

(一)細胞組織間隙的結締組織 (interstitial connective tissue)：

屬於非上皮細胞，由纖維母細胞 (fibroblasts)、骨質母細胞 (osteoblasts)、軟骨細胞 (chondrocytes) 以及巨噬細胞 (macrophage) 所構成，主要作為支撐作用。

(二)基底層 (basal lamina)：

主要為提供上皮層的基礎，可將上皮細胞圍繞，並對於組織修復和組織形成時的細胞遷移相當重要，由基板、基質、和網狀纖維所構成。基底膜的主要成分為 (a) type-IV 膠原蛋白 (b) laminin (c) heparin sulfate (d) chondroitin sulfate (e) entactin。參與分解細胞外基質的酵素主要分為四大類：
I、金屬蛋白水解酶：interstitial collagenase、type-IV collagenase、stromelysin；
II、Serine 蛋白水解酶：plasminogen activator、plasmin；III、Cystein 蛋白水解酶：cathepsin B、cathepsin L；IV、Aspartyl 蛋白水解酶：cathepsin D。

第五節 Chalcone 的背景介紹

Chalcone 是由繖形科 (Umbelliferae) 當歸屬 (Angelica) 的明日葉 (*Angelica keiskei koidzumi*) 莖幹汁液所萃取出化合物 (劉等, 1998；沈,

2000；馬場, 2000；劉等, 2001)，屬於類黃酮 (flavonoid) 的一種（附圖二），主要含有兩種化學成分：(1)4-hydroxyderricin (2)Xanthoangelol A、B、C、D，是天然的多酚類抗氧化物，具有抗氧化力及 SOD 活性（張, 2001）。Chalcone 其化學名稱為 (2E)-1,3-Diphenyl- 2-propen-1-one，其分子式為 $C_{15}H_{12}O$ ，分子量為 208.25518。

古書記載秦始皇，曾派遣使者到日本找尋長生不老藥，可能就是指原產於八丈島的明日葉，因其具有旺盛的生命力，今日摘取其植株葉片，明日幼芽便再生長出來，故稱明日葉，日本名為 *Ashitaba*，別名為為八丈草、八丈芹、長壽草、明日草、珍立草、返陽草、靈草（江, 1990；劉, 1999；馬場, 2000；沈, 2000；楊, 2001；張, 2001；劉等, 2001；余, 2002），是一種多年生耐寒草本植物，其嫩莖葉或全草可供為蔬菜用及保健用（劉等, 2001；余, 2002），為目前頗受日本人重視之新興植物之一。明日葉含有豐富的食物纖維、維生素 A、B1、B2、B6、B12、維生素 C、維生素 E、生物素、胡蘿蔔素、菸鹼酸、葉酸、葉綠素、泛酸、膽鹼、磷、鈣、鎂、鉀、錳、鐵以及可以淨化血液的有機鍍和特有的 chalcone，其部分成份，有助於利尿、通便和促進新陳代謝等。明日葉的相關產品在亞洲國家相當銷，近年來明日葉被引進台灣種植生產，主要集中嘉義阿里山奮起湖龍雲山莊、溪頭森林遊樂場、南投埔里大雪山農場以及苗栗西湖鄉神農農場。

之前文獻報告指出，chalcone 具有許多藥理活性，包括抗菌 (Friss-Moller *et al.*, 2002；Liu *et al.*, 2011)；對於格蘭氏陽性菌中的 *Staphylococcus aureus* 和 *Staphylococcus epidermidis* 具有抗菌力，而對於 *Micrococcus luteus* 的抗菌功效則與 Gentamycin 具有同等效力 (Inamori *et*

al., 1991)。

此外，chalcone 可以抗氧化 (Vogel *et al.*, 2010)、抗瘧疾 (Liu *et al.*, 2003)、抗肺結核 (Lin *et al.*, 2002)、防治血栓 (Fujita *et al.*, 1992)，抑制豬黏膜中的胃酸，使潰瘍傷口癒合 (Murakami *et al.*, 1990)，透過抑制 BV2 小膠質細胞的 Akt/NF κ B pathway 進而抑制 Toll-like receptor 4 所引起的發炎反應 (Lee *et al.*, 2012)，透過抑制第二型 CD4 T 細胞的功能進而抑制過敏性的氣喘 (Iwamura *et al.*, 2010)。

目前還有研究指出，chalcone 會誘導人類急性白血病細胞株凋亡 (Maioral *et al.*, 2012)，抑制肺癌細胞的 DNA 合成 (Kimura and Baba, 2003)、生長和轉移 (Kimura *et al.*, 2004)，抑制人體鱗狀細胞癌的生長 (Lin *et al.*, 2012)。另外，chalcone 會藉由抑制 CACR4 趨化因子受體的表現，進而抑制乳癌及大腸癌細胞的侵襲 (Wang *et al.*, 2012)，也會透過 apoptosis 和 autophagy 使骨髓瘤細胞死亡 (Zhao *et al.*, 2012)。

第二章 研究動機

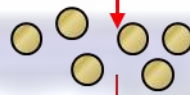
根據行政院衛生署公布之台灣十大死亡原因的統計資料，顯示自從民國七十一年惡性腫瘤取代腦血管疾病起，迄今仍為十大死因之首。癌症是透過許多複雜的因素所形成的，其中形成的原因已有許多研究證實，但是治療的效果仍然有限。

T24 膀胱癌細胞為一高度惡化的膀胱過渡性上皮細胞，可藉由血液及淋巴系統擴散到身體的其他組織器官，造成癌症的轉移，奪取正常組織器官的養分，即使腫瘤經由手術切除或放射線治療後，還是難以根治，導致病患病癒後狀況不佳，甚至病灶復發至死。

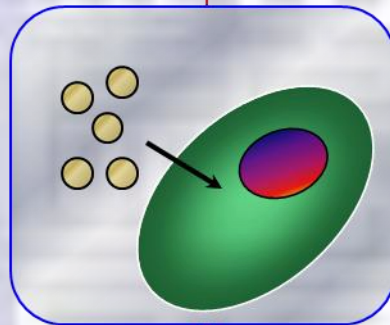
Chalcone 為明日葉之萃取物，是類黃酮物質 (flavonoid) 的一種，亦是天然的多酚類抗氧化物，先前的文獻中顯示，chalcone 具有抗菌、抗氧化、抗發炎、抗瘡疾、抗肺結核、預防血栓、使胃潰瘍傷口癒合及抑制過敏性氣喘等生理活性，更有研究指出，chalcone 會誘導人類急性白血病細胞株凋亡，抑制肺癌細胞的 DNA 合成、生長和轉移，及抑制人體鱗狀細胞癌的生長。

我們知道癌細胞的入侵與細胞間質的分解、細胞的貼附能力及細胞的移動性有關。本實驗主要的研究動機在於 chalcone 是否可以有效的抑制 T24 膀胱癌細胞的侵入能力及移動性，並進一步探討其分子機轉。

第三章 研究架構



Chalcone



T24 Transitional
cell carcinoma

- 1. Analysis of cell viability (MTT assay)**
- 2. Wound-healing assay**
- 3. Boyden chamber invasion and migration assay**
- 4. Gelatin zymography assay**
- 5. Casein-plasminogen zymography assay**
- 6. PCR / DNA electrophoresis**
- 7. Western blotting assay**

第四章 實驗材料與方法

第一節 實驗材料及實驗設備

一、藥品試劑

1. Chalcone 分析試藥

1.1 購自美國 Extrasynthese 公司：

Chalcone，HPLC 級，純度 $\geq 95\%$ (分子式為 $C_{15}H_{12}O$ ，分子量為 208.27)

2. 蛋白質電泳相關試藥

2.1 購自 Bio Basic 公司：

Acrylamide/ Bis-acrylamide 30% solution (29:1)、Glycine、Coomassie brilliant blue G-250

2.2 購自 J.T. Backer 公司：

Ammonium persulfate (APS)、TWEEN 20、Triton X-100、
N,N,N',N'-Tetra-methylethylenediamine (TEMED)

2.3 購自美國 MACRON 公司：

Methanol

2.4 購自 Page Ruler 公司：

Prestained Protein Ladder

2.5 購自 Uni Region Bio-Tech 公司：

Sodium dodecyl sulphate (SDS)

3. MTT 實驗試藥

3.1 購自 Bio Basic 公司：

3-[4,5-dimethylthiazol-z-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide

3.2 購自 MACRON 公司：

Isopropyl Alcohol

4. 細胞培養試藥

4.1 購自 Biological Industries 公司：

penicillin / streptomycin / amphotericin (PSA)

4.2 購自 Gibco 公司：

Fetal bovine serum (FBS)

4.3 購自 Sigma 公司：

Dimethyl Sulfoxide (DMSO)

4.4 購自美國 Sigma-Aldrich 公司：

McCoy's 5A

4.5 購自 Uni Region Bio-Tech 公司：

Dulbecco' Phosphate-Buffered Saline (PBS)

5. 抗體

5.1 購自 BD 公司：

NF- κ B、c-Fos、c-Jun、phospho-ERK、ERK、phospho-P38、P38、Ras、
PI3K、Akt

5.2 購自 Chemicon 公司：

β -actin

5.3 購自 Santa Cruz 公司：

C23、RhoA、RhoB、Rac-1、cdc42、MMP-2、MMP-9、u-PA、phospho-JNK、
JNK、Anti-mouse (HRP)、Anti-rabbit (HRP)

5.4 購自 Invitrogen 公司：

phospho-Akt、phospho-FAK、FAK

6. 其它耗材

6.1 購自 MILLIPORE 公司：

PVDF membrane

二、 實驗設備

<u>名稱</u>	<u>廠牌與機型</u>
天平	DENVER TP1102
微量天平	DENVER TP214
直立式電泳槽	Tanon
電泳轉印槽	Tanon
電源供應器	Major science MP-300V
加熱攪拌器	Major science

冷凍離心機	HERMLE 2216K
迷你離心機	NATIONAL LABNET CO, C-1200
高速離心機	Digisystem
光譜儀	Thermo He λ ios α
酸檢測定儀	JENCO 6173pH
無菌操作台	HIGH TEN SCIENTIFIC CORPORATION, Laminar flow
細胞培養箱	REVCO RCO3000T
烘箱	CHANNEL
超音波振盪器	BRANSON 8200
水浴槽	HIPOINT BC-2D
水平式搖晃器	Digisystem

倒立式顯微鏡	Olympus CKX41
高壓滅菌釜	TOMIN TM 322
-80°C 冰箱	Kaltis 499
冷光影像分析儀	FUJIFILM LAS-3000mini
PCR 儀器	Labnet international Mutigene
核酸磁珠純化儀器	Thermo scientific Kingfisher
ms incubators	Major science
UV crosslinker	Spectroline

三、緩衝液及溶液

SDS-PAGE 製備：separating gel

SDS-PAGE 的下層膠可依照實驗需要而決定 acrylamide 所占的百分濃度，較常配置的百分濃度有 8%、10%、12% 三種。首先會將 ddH₂O 、 acrylamide 及 Tris-HCL (pH8.8) 、 ammonium persulfate、SDS 加在一起，並

搖晃均勻，最後再加入 TEMED，混合均勻後，倒入架好的直立式膠台座中（約三分之二的位罝），剩下三分之一則用甲醇補滿，靜置約 20 分鐘，等待下層膠凝固。

0.1% Gelatin-8% SDS-PAGE (substrate SDS-PAGE)製備：separating gel

substrate SDS-PAGE 主要是在下層膠的地方加入了明膠 (gelatin)，通常 substrate SDS-PAGE 下層膠的 acrylamide 所占的百分濃度為 8%，而配法與 SDS-PAGE 一樣，差別在於 acrylamide 與 bis-acrylamide 之間的比例不同。首先將 ddH₂O、acrylamide 及 Tris-HCL (pH8.8)、ammonium persulfate、SDS 和 gelatin 加在一起，並搖晃均勻，最後再加入 TEMED，混合均勻後，倒入架好的直立式膠台座中（約三分之二的位罝），剩下三分之一則用甲醇補滿，靜置約 20 分鐘，等待下層膠凝固。

4% Stacking gel 製備

上層膠主要是作為聚集 sample 之用，而 SDS-PAGE 和 substrate SDS-PAGE 的上層膠配法一樣，主要差別在於 acrylamide 與 bis-acrylamide 之間的比例。而配製過程與配置下層膠一樣，只是在倒入膠台後要插入 comb，此時要注意避免產生氣泡，靜置 20 分鐘後，等待上層膠凝固即可。

Transfer buffer 製備

首先，先秤 6.2 g 的 Tris-base 和 28.8 g 的 glycine，接著在加入 400 ml 的 Methanol，最後再加入 ddH₂O 至 2000 ml 即可。

Running buffer (5X) 製備

首先，先秤 15 g 的 Tris-base 和 72 g 的 glycine 以及 5 g 的 SDS，最後再加入 ddH₂O 至 1000 ml 即可。

Zymography washing buffer 製備

由於 Triton X-100 屬於界面活性劑，具有濃稠的性質。因此，先將 Triton X-100 用量筒取 25 ml 置入瓶內，接著再加入 ddH₂O 至 1000 ml 即可。

Zymography reaction buffer 製備

在 zymography reaction buffer 的製備，我們先配置高濃度的溶液 (2 M Tris-HCl, pH8.0、1M CaCl₂ 及 1% NaN₃)，放置於 4°C 冰箱備用。在使用時，取 10 ml 的 2 M Tris-HCl, pH8.0，5 ml 的 1 M CaCl₂ 及 5 ml 的 1% NaN₃，再加 ddH₂O 至 500 ml 混合均勻備用。

Staining solution buffer 製備

染色液的配置，依序加入 Comassie blue R-250 0.625 g、227 ml 的 Methanol 及 227 ml 的 ddH₂O，混合均勻（在混合過程中需放置於冰上），等完全溶解後再加入 46 ml 的醋酸，混合均勻，放置於室溫備用。

Destaining solution 製備

退色液的配置，依序加入 50 ml 的甲醇及 75 ml 的醋酸，再加入 ddH₂O 至 1000 ml，混合均勻，放置於室溫備用。

TBS buffer (10X) 製備

先將秤好的 Tris-base 以及 NaCl 倒入量筒中，再倒入 ddH₂O，使其粉末溶解，再校正 pH 值至 7.6，並儲存於 4°C 即可。

TBST buffer 製備

Tween 20 屬於界面活性劑，具有濃稠的性質，因此，利用 pipetman 緩緩吸取 1 ml 的 Tween 20，再緩緩的加進 TBS buffer 中，即可。

Blocking buffer 製備

先秤 2.5 g 的脫脂奶粉，再用 50 ml 的 TBS buffer 溶解即可。

第二節 實驗方法

1. 細胞培養 (Cell culture)

【1-1】解凍細胞 (Thawing cell)

將含有 T24 細胞的冷凍管由液態氮桶快速置於 37°C 的水浴槽，於 1 分鐘內急速解凍並置入內含培養液的離心管中，在 4°C 下，離心 1000 rpm，5 分鐘，去除含有 McCoy's 5A 的上清液，以含有 10% 胎牛血清的新鮮培養液將細胞均勻打散注入內含培養液的 10 cm 培養皿中，置於 37°C 含 5% CO₂ 的培養箱中生長，每四天更換一次培養液。

【1-2】繼代培養 (Subculture)

T24 (人類膀胱癌細胞株)培養在含有 10% fetal bovine serum、1% penicillin / streptomycin / amphotericin、1% glutamine 的 McCoy's 5A，待細胞

長滿後，將舊的細胞培養液吸出，加入 3 ml 的 PBS 清洗 2 次，接著再以 2 ml 的 1X trypsin-EDTA 覆蓋所有細胞後，在培養箱下靜置 5 分鐘後，用手輕輕拍打培養皿幫助細胞能完全脫離培養皿，加入 2 ml 含有 10% fetal bovine serum 的培養液抑制 trypsin 活性，經離心 1300 rpm，5 分鐘後去除上清液，以新鮮的培養液將細胞打散並繼續培養之。

【1-3】冷凍細胞 (Cell freezing)

首先將培養皿中舊的細胞培養液吸出，加入 3 ml 的 PBS 清洗 2 次，以 1X trypsin-EDTA 打下所有細胞，經離心 1300 rpm，5 分鐘後，將上清液去除，用手指輕微拍散細胞，再加入 3 ml 冷凍細胞培養液 McCoy's 5A 與細胞培養液 1:9 混合均勻)，以每個冷凍管 1 ml 將細胞移到冷凍管中，再將冷凍管置於 4°C 冷藏 5 分鐘，-20 °C 冷凍 30 分鐘，再置於 -80 °C 冷凍 16 小時，最後將冷凍管移至液態氮桶內。

2. 細胞存活率分析 MTT (Microculture Tetrazolium) assay

本實驗是用來測試細胞是否有活性及存活的方法，有活性的活細胞會將 MTT reagent 經由粒腺體中的 succinate dehydrogenase 作用代謝還原成藍紫色結晶，待此作用四小時之後再以異丙醇 (isopropanol) 將結晶溶出，並於波長 563 nm 下測定溶液吸光，由吸光強度的大小可得知有活性的細胞數多寡，因此若溶液的吸光值有降低，則表示細胞的存活率下降，故也可以藉此方法來判定細胞存活與死亡的情形。

將 T24 cells (4×10^4 cells / well) 培養於 24 well culture plate，待細胞貼附後，移去培養液，換置入依實驗設計含不同濃度的 chalcone (1、2.5、5、10、

20、30 $\mu\text{g/ml}$)，以未加任何 chalcone 為控制組，於培養箱中反應 24 及 48 小時，移除 medium 後，加入 900 μl 的 McCoy's 5A 和 100 μl MTT solution (5 mg/ml) 於培養箱中反應 4 小時，移除 medium (含 MTT) 後，加入 isopropanol 將結晶溶出，最後在 563 nm 波長下測定溶液 OD 值，以未加任何藥物處理的細胞之吸光值為對照組，最後以實驗組之吸光值除以對照組之吸光值，計算出細胞之相對存活百分比。

3. 傷口癒合分析 (Wound healing assay)

將細胞種於 6 well plate (4×10^4 / well) 以含 10 % FBS 之 McCoy's 5A 培養液培養 24 小時後，以 yellow tip 在每個 well 中畫出兩條傷口，以 PBS 洗 2 次，在每個 well 加入不同濃度之 chalcone (1、2.5、5 $\mu\text{g/ml}$)，以未加任何 chalcone 為控制組，觀察 0、24、48 小時傷口癒合情形。

4. 細胞移動性分析 (Cell migration assay)

首先於 6 well plate 種入 T24 cells (4×10^4 cells/well)，隔天即加入不同濃度的 chalcone 分別為 1、2.5、5 μM ，以未加任何 chalcone 為控制組。48 小時後，利用 PBS 清洗，並加入 2 ml 的 1X trypsin- EDTA 使細胞自培養皿上脫離，經離心後去除上清液，並溶於 starvation DMEM 培養液，並利用 trypan blue 計算細胞數，以待備用。利用 48 well Boyden chamber 的分析方法，將 Boyden chamber 放置於桌面，於 lower chamber 的每個 well 放入 30 μl 的 10% FBS 的 McCoy's 5A 培養液，接著放置 Polycarbonate Membrane 及軟墊，再置入 upper chamber，於 upper chamber 的每個 well 注入 50 μl

(2.5×10^4 cells) 細胞溶液，每種條件均要做 3 次，注意避免氣泡產生，放置於 37°C ，待細胞移動 6 小時以後，小心取下 Polycarbonate Membrane，以 methanol 固定細胞 10 分鐘，風乾 10 分鐘後，再以 Giemsa (1:20) 染色 2 小時，最後固定住 filter，之後將棉花沾溼清水將 filter 背面擦拭乾淨，在 400X 顯微鏡下每個 well 隨機選取 3 個，共取 5 個 well，作移動細胞數之統計。

5. 細胞侵入性分析 (Cell invasion assay)

利用 6 well Boyden chamber 的分析方法，於 lower chamber 的每個 well 放入 30 μl 的 10% FBS 的 McCoy's 5A 培養液，接著放置 Polycarbonate Membrane 及軟墊，再放上 upper chamber，將 upper chamber coating 上 Matrigel，在 laminar flow 風乾 2 小時之後，於 upper chamber 的每個 well 注入 50 μl (2.5×10^4 cells) 細胞溶液，每種條件均要做 3 次，注意避免氣泡產生，放置於 37°C ，待細胞移動 8 小時以後，小心取下 Polycarbonate Membrane，以 methanol 固定細胞 10 分鐘，風乾 10 分鐘後，再以 Giemsa (1:20) 染色 2 小時，最後固定住 filter，之後將棉花沾溼清水將 filter 背面擦拭乾淨，在 400X 顯微鏡下每個 well 隨機選取 3 個，共取 5 個 well，作移動細胞數之統計。

6. MMP-2,-9 活性分析 (Gelatin zymography)

將細胞種於 10 cm 的培養皿中 (4×10^4 / well) 以 starvation McCoy's 5A 培養液培養 24 小時後，以 PBS 洗 2 次，在每個 well 加入不同濃度之

chalcone (1、2.5、5 μM)，以未加任何 chalcone 為控制組，經過 24 小時處理後，分別收集不同濃度的培養液，並利用 Gelatin zymography 測定 MMP-2 及 MMP-9 的活性。

首先製備 0.1% Gelatin-8% SDS-PAGE 電泳膠片，並置於含有電泳緩衝液的電泳槽中，取 16 μl sample (蛋白質濃度 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)，加入 4 μl loading buffer 均勻混合後，注入膠片中，分別以 70 V 與 110 V 的電壓進行電泳分離。結束電泳分離後，將膠拆下，加入 50 ml 的 washing buffer 在室溫下搖晃 30 分鐘，共兩次。倒掉 washing buffer 之後，加入 50 ml 的 reaction buffer，於 37°C 恆溫箱下反應 12 至 16 小時。將反應完後的膠片，以 staining solution 於室溫染色 1 小時，再以退色液退染 30 分鐘，觀看結果。

7. u-PA 活性分析 (Casein-plasminogen zymography)

在製備 8% SDS-PAGE 電泳膠片，並且在其下層膠加入 2% 的 casein 及 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 plasminogen。置於電泳槽中，並加入電泳緩衝液。取 16 μL sample (蛋白總量 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)，加入 4 μl loading buffer，將 sample loading 到電泳片中，分別以 70 V 與 110 V 的電壓進行電泳分離。結束電泳分離後，將膠拆下，加入 50 ml 的 washing buffer，在室溫下洗 30 分鐘，共兩次。倒掉 washing buffer 之後，加入 50 ml 的 reaction buffer，於 37°C 恆溫箱下反應 12 至 16 個小時。將反應完後的膠片，以 staining buffer 染色 1 個小時，之後再以退色液退染 30 分鐘，觀看結果。

8. 西方點墨法 (Western blot)

【8-1】細胞萃取液之製備 (Preparation of the total cell lysates)

將培養皿內的培養液吸取後，以 PBS 沖洗兩次，刮取細胞並加入 RIPA buffer 以及蛋白酵素抑制劑，在 4°C 下振盪 10 分鐘，在 4°C 下，以 13000 rpm，15 分鐘後，吸取上清液並存於 -70°C 備用。

【8-2】蛋白質之定量 (Protein quantitation)

利用蛋白質可與 Coomassie brilliant blue G-250 形成藍色之複合物，當於波長 595 nm 有一較大的吸光值，以此定量蛋白質。

測試方法先以 BSA (bovine serum albumin) 為蛋白質標準溶液，換算細胞萃取液的蛋白質濃度。先取 10 μ l 的 T24 細胞萃取液稀釋 10 倍，再取 30 μ l 細胞萃取稀釋液加入 1 ml 蛋白定量試劑組(Coomassie blue total protein reagent)，在室溫下反應 1 分鐘，於波長 595 nm 測定吸光值，最後將樣品與標準曲線對照後計算出待測物之蛋白質濃度，即可根據標準曲線求得樣品蛋白之濃度。

【8-3】樣品的製備 (Preparation of sample)

將已定量之 whole cell lysate，取 20 μ g 的蛋白質樣本，加適量之 5X loading dye，再以二次水將各 sample 之體積補至固定體積，混合均勻，以 100 °C 加熱 10 分鐘，加熱完後再迅速置於冰上 5 分鐘，在經低速離心後置於冰上，分別將樣品注入 SDS-PAGE 電泳膠內，分別以 70V 與 110V 的電壓進行電泳分析。

【8-4】蛋白質樣本之轉漬 (Electrotransfer)

電泳完畢後將膠體取出，截去上層膠後，先將硝化纖維紙 (Nitrocellulose membrane, NC paper) 置於兩張經 transfer buffer 潤濕過的濾紙上，NC paper

需事先經 transfer buffer 浸濕，NC paper 上面再放上膠體，再放上兩張經 transfer buffer 浸濕過的濾紙，並用玻璃棒趕走夾在其中的氣泡，最後再以夾板（內含海綿襯墊）夾緊，放入轉漬槽中，同時要將冰磚放入轉漬槽中，以固定電壓 110 V 轉漬約 1 個小時。

【8-5】免疫墨點法 (Immunoblot)

轉漬完後將 NC paper 取出，用 TBST buffer 洗三次，每次 10 分鐘，再以 blocking buffer 於 4 °C 下作用 1 小時。之後，倒掉 blocking buffer，再以 TBST buffer 洗三次，每次 10 分鐘。換上一級抗體（配於 TBS buffer 中），於 4 °C 下溫和作用 overnight，隔天再以 TBST buffer 洗三次，每次 10 分鐘。接著，再換上二級抗體，於 4 °C 下溫和作用 1 小時，再以 TBST buffer 洗三次，每次 10 分鐘。最後將 NC paper 放至感光盤 (Tray) 上，用面紙擦去 NC paper 上多餘的 TBST buffer，再以冷光劑覆蓋整個 nitrocellulose membrane，接著將感光盤放入 FUJIFILM LAS-3000 mini 之冷光螢光影像分析儀進行拍照。

9. DNA 的萃取 (Preparation of DNA)

將 4×10^4 細胞與 200 μ l Lysis Buffer 1 加入微量管中稍微震盪，另外可放入 30 μ l RNase A 及 30 μ l proteinase K，並置於室溫下反應 15 至 20 分鐘。接下來以自動化核酸磁珠純化儀進行萃取 DNA。

10. 引子設計

本實驗所需之引子序列皆於附表一。

11. 聚合酵素連鎖反應 (Polymerase chain reaction)

取 2 μ l cDNA 加入 1 μ l RNase free H₂O，加入 1 μ l forward primer 與 1 μ l reverse primer，再加入 5 μ l Go taq Green Master Mix，先以 95°C，10 分鐘進行變性，溫度循環機於開始進入第 1 個循環處理 95°C，1 分鐘 (denaturation)，60°C (annealing) 1 分鐘，72°C 反應 1 分鐘連續 30 個循環後，最後以 72°C (elongation) 反應 10 分鐘最後產物以 4°C 保存。

12. DNA 電泳 (DNA electrophoresis)

取 9 μ l PCR 產物以及 2.5 μ l DNA marker 分別注入 agarose 電泳膠片內，以 110V 電壓進行電泳 30 分鐘後，在 UV 光下觀察所要的基因產物是否會在相對應的 DNA marker 處有所表現。

13. 統計分析 (Statistical analysis)

數據以 mean \pm SD 表示。以 Student *t*-test unpaired 來評估統計異。
 $P < 0.05$ 表示具有顯著差異性。

第五章 實驗結果

一、Chalcone 對 T24 膀胱癌細胞存活率的影響

將 T24 膀胱癌細胞給予不同劑量的 chalcone (0、1、2.5、5、10、20 和 30 μM)，處理 24 與 48 小時，以 PBS 清洗將藥物移除，進行 MTT assay。與控制組之結果做比較，發現不同濃度的 chalcone (0、1、2.5 和 5 μM) 處理 24 與 48 小時之後，不會影響 T24 細胞的存活率，但高濃度的 chalcone (10、20 和 30 μM) 會影響 T24 細胞的存活率。本實驗是針對抑制癌細胞的轉移，因此想觀察在不影響細胞的生長的情況下，低濃度的 chalcone 是否能抑制 T24 細胞的轉移能力 (Fig. 1)。

二、Chalcone 影響 T24 膀胱癌細胞的移動能力

T24 細胞經不同濃度的 chalcone (0、1、2.5 和 5 μM) 處理 0、24 及 48 小時之後，利用傷口癒合實驗分析 T24 細胞移動情形。結果發現，細胞暴露在不同濃度的 chalcone 24 小時之後，與控制組 (0 μM) 做比較，5 μM 的 chalcone 有抑制 43% 的 T24 細胞移動。另外，細胞處理不同濃度的 chalcone 48 小時之後，5 μM 的 chalcone 即有顯著抑制 62% 的 T24 細胞移動。此外，T24 細胞經由 5 μM 的 chalcone 在 48 小時處理之下和 0 μM 相比較，細胞移動情形明顯地被抑制，且呈現濃度與時間上的依賴現象 (Fig. 2)。

三、Chalcone 影響 T24 膀胱癌細胞之 invasion 能力

T24 細胞經不同濃度的 chalcone (0、1、2.5 和 5 μM) 處理 24 小時之

後，利用 Boyden chamber 的方法分析 T24 細胞 invasion 的能力，實驗結果顯示，T24 細胞在 2.5 μ M 之 chalcone 處理下，cell invasion 的數目大約減少 40%；在 5 μ M 之 chalcone 處理下，cell invasion 的數目最少，大約減少 57%。其侵入能力會隨著 chalcone 濃度增加而有所降低，且呈現濃度的依賴現象，代表 chalcone 可以抑制 T24 膀胱癌細胞的侵入能力 (Fig. 3)。

四、Chalcone 抑制 T24 膀胱癌細胞 MMP-2、MMP-9 及 u-PA 酵素活性及蛋白的表現

由 gelatin zymography 及 casein-plasminogen zymography 分析法，觀察 T24 細胞經不同濃度的 chalcone (0、1、2.5 和 5 μ M) 處理 24 小時之後，細胞中 MMP-2、MMP-9 與 u-PA 的活性。在無血清 (serum free) 下處理不同濃度的 chalcone 經過 24 小時之後，收取細胞培養液，以 gelatin zymography 及 casein-plasminogen zymography 分析 MMP-2、MMP-9 與 u-PA 的活性。結果發現，與控制組比較，在 24 小時之後，MMP-2、MMP-9 與 u-PA 的活性會隨著 chalcone 濃度的增加而明顯的下降 (Fig. 4)。另外，將 T24 細胞經不同濃度的 chalcone (0、1、2.5 和 5 μ M) 處理 24 小時之後，收集細胞培養液，利用西方墨點法，分析 T24 細胞將 MMP-2 及 MMP-9 分泌至細胞外的表現，結果發現，隨著 chalcone 濃度增加，分泌至細胞外的 MMP-2 及 MMP-9 表現量也明顯地降低 (Fig. 5)。

五、Chalcone 抑制 T24 膀胱癌細胞 MMP-2、MMP-9 及 u-PA mRNA 的

表現

經 polymerase chain reaction 及 DNA electrophoresis 分析後，觀察 T24 細胞經不同濃度的 chalcone (0、1、2.5 和 5 μ M) 處理 12 小時之後，細胞中 MMP-2、MMP-9 與 u-PA messenger RNA 的表現。結果發現，與控制組比較，在 12 小時之後，MMP-9 的活性在 0 μ M 至 2.5 μ M 沒有明顯的改變，而在 5 μ M 時，MMP-9 的活性是呈現下降的結果。另外，MMP-2 與 u-PA messenger RNA 的表現會隨著 chalcone 濃度的增加而下降 (Fig. 6)。

六、Chalcone 調控 T24 膀胱癌細胞移動之訊息傳遞路徑分析 (Western blot 分析)

為了要探討 chalcone 抑制 T24 細胞之 MMP-2/MMP-9 活性，細胞移動及侵襲能力與訊息蛋白表現之間的相關性，本實驗利用不同濃度的 chalcone (0、1、2.5 和 5 μ M) 處理 T24 細胞，收集 cell lysates 並利用西方墨點法，加以分析訊息傳遞路徑中轉移相關之蛋白的表現情形。

6.1 Chalcone 調控 FAK、ERK、p38、JNK 及 PI3K/Akt 的磷酸化表現

將 T24 細胞經不同濃度的 chalcone (0、1、2.5 和 5 μ M) 處理 24 小時之後，由結果發現 FAK、ERK、p38、JNK 及 Akt 之磷酸化表現與 PI3K 的蛋白質表現皆會受到 chalcone 的影響，且有隨著濃度增加而有加強抑制的效果 (Fig. 7)。

6.2 ERK1/2 的專一性磷酸化抑制劑對 MMP-2/MMP-9 和 u-PA 的影響

利用 ERK 專一性的磷酸化抑制劑：U0126 (10 和 20 μ M) 與 chalcone (1 μ M) 處理於 T24 細胞，結果發現，同時處理 chalcone 與 U0126 其抑制

MMP-9/MMP-2 和 u-PA 的能力比單獨處理 U0126 有更好的抑制效果 (Fig. 8)。

6.3 p38 的專一性磷酸化抑制劑對 MMP-2/MMP-9 和 u-PA 的影響

利用 p38 專一性的磷酸化抑制劑：SB203580 (5 和 10 μ M) 與 chalcone (1 μ M) 處理於 T24 細胞，結果發現，同時處理 chalcone 與 SB203580 其抑制 MMP-9 和 u-PA 的能力比單獨處理 SB203580 有更好的抑制效果 (Fig. 9)。

6.4 JNK1/2 的專一性磷酸化抑制劑對 MMP-2/MMP-9 和 u-PA 的影響

利用 JNK 專一性的磷酸化抑制劑：SP600125 (10 和 20 μ M) 與 chalcone (1 μ M) 處理於 T24 細胞，結果發現，同時處理 chalcone 與 SP600125 其抑制 MMP-9 和 u-PA 的能力比單獨處理 SP600125 有更好的抑制效果 (Fig. 10)。

6.5 PI3K 的專一性磷酸化抑制劑對 MMP-2/MMP-9 和 u-PA 的影響

利用 PI3K 專一性的磷酸化抑制劑：LY294002 (10 和 20 μ M) 與 chalcone (1 μ M) 處理於 T24 細胞，結果發現，同時處理 chalcone 與 LY294002 其抑制 MMP-9/MMP-2 和 u-PA 的能力比單獨處理 LY294002 有更好的抑制效果 (Fig. 11)。

6.6 Chalcone 調控 small GTPase family (Ras、RhoA、RhoB、Cdc42、

Rac-1)之蛋白表現

將 T24 細胞經不同濃度的 chalcone (0、1、2.5 和 5 μ M) 處理 24 小時之後，結果發現，Ras、Cdc42、Rac-1、RhoA、RhoB 蛋白的表現量會隨著處理濃度的增加而逐漸遞減。(Fig. 12)。

七、Chalcone 抑制 T24 膀胱癌細胞中轉錄因子 NF- κ B、c-Fos 與 c-Jun 蛋白的表現量

由上述結果 (Fig. 7) 發現，p-FAK、p-ERK、p-p38、p-JNK、p-Akt 及 PI3K 明顯地受到 chalcone 的抑制。因此接下來想進一步了解會受到 p-ERK、p-p38、p-JNK 及 p-Akt 調控的下游轉錄因子蛋白表現，是否也會因 p-ERK、p-p38、p-JNK 及 p-Akt 降低而降低；另外由上述結果 (Fig.4) 發現，chalcone 影響 T24 膀胱癌細胞移動，有可能是 chalcone 能抑制 MMP-2 和 MMP-9 的表現，而調控 MMP-2 和 MMP-9 表現之轉錄因子有 NF- κ B、c-Fos 及 c-Jun，因此將 T24 細胞經不同濃度的 chalcone (0、1、2.5 和 5 μ M) 處理 24 小時後，分離出細胞核蛋白，利用西方墨點法並分析細胞核中 NF- κ B、c-Fos 及 c-Jun 蛋白之表現。實驗結果發現，隨著 chalcone 濃度增加，細胞核中 NF- κ B、c-Fos 及 c-Jun 的蛋白表現量也明顯地降低 (Fig. 13)。另外，將 T24 細胞經不同濃度的 chalcone (0、1、2.5 和 5 μ M) 處理 24 小時之後，利用西方墨點法並分析細胞質中 NF- κ B、c-Fos 及 c-Jun 蛋白之表現。結果發現，隨著 chalcone 濃度增加，細胞質中 NF- κ B、c-Fos 及 c-Jun 的蛋白表現量也明顯地降低 (Fig. 14)。

第六章 討論

近年來台灣的癌症發生率年年上升，根據行政院衛生署統計資料顯示，自民國 75 年至今，惡性腫瘤一直是台灣國人十大死因之首，其原因是癌細胞會不斷增生並且轉移至全身各處的組織或器官，藉由奪取正常組織器官的養分進而造成器官功能的衰弱，導致病患最終死亡的原因。因此，對於惡性腫瘤的預防與治療研究上，都著重於抑制癌細胞的不正常增生 (proliferation) 以及轉移 (metastasis) 這兩部分 (Gao *et al.*, 2005; Ito *et al.*, 2004; Olaso *et al.*, 2002)。另外，為了使癌細胞獲得更多的養分及空間，癌細胞會分泌許多不同的蛋白水解酵素，造成細胞周邊許多生理狀態的改變，其中包括細胞與細胞外基質 (ECM) 之間的結合能力改變，細胞與細胞間相互作用力的破壞，及細胞外基質 (ECM) 的分解 (Okamoto and Watanabe, 2003)。

膀胱癌是一種和環境致癌物質密切相關的癌症，也是台灣最常見的泌尿系統癌症，一旦發現轉移擴散，即使透過手術切除或放射線治療，都難以根除，造成病人預後狀況不佳。因此，從天然植物中尋求效力強且安全的純化合物，將是相當重要的研發工作。

目前傳統中草藥對人體健康的影響已逐漸被重視，並且許多生物醫學的研究已經證明中草藥的藥理活性。最近許多研究顯示 chalcone 具有抗菌 (Friss-Moller *et al.*, 2002； Liu *et al.*, 2011)、抗氧化 (Vogel *et al.*, 2010)、抗瘧疾 (Liu *et al.*, 2003)、抗肺結核 (Lin *et al.*, 2002)、防治血栓 (Fujita *et al.*, 1992)、抑制過敏性氣喘的功效 (Iwamura *et al.*, 2010)。有文獻指出，chalcone 會誘導人類急性白血病細胞株凋亡 (Maioral *et al.*, 2012)，抑制肺癌細胞的 DNA 合成 (Kimura and Baba, 2003)、生長和轉移 (Kimura *et al.*, 2004)，抑制

人體鱗狀細胞癌的生長 (Lin *et al.*, 2012)。另外，Chalcone 會藉由抑制 CACR4 趨化因子受體的表現，進而抑制乳癌及大腸癌細胞的侵襲 (Wang *et al.*, 2012)，也會透過 apoptosis 和 autophagy 使骨髓瘤細胞死亡 (Zhao *et al.*, 2012)。而 T24 細胞為高度惡化的膀胱癌細胞，具有高度的轉移能力，因此我們嘗試以 chalcone 刺激 T24 膀胱細胞後，研究其對於膀胱癌的侵入、移動能力及一些相關的蛋白水解酵素，和其間所涉及的分子機制。

首先我們以 MTT assay 初步分析 chalcone 對 T24 細胞活性及存活率的影響 (Fig. 1)。結果中顯示高劑量的 chalcone (30 μ M) 會降低 T24 細胞的存活率，而在處理低劑量 (0 至 5 μ M) 時則不會影響 T24 細胞的存活率。由於本實驗是針對抑制癌細胞的轉移，因此想觀察在不影響細胞的生長的情況下，低濃度的 chalcone 是否能抑制 T24 細胞的轉移能力，所以本實驗以 0 至 5 μ M 的 chalcone 作為後續研究對 T24 膀胱癌細胞抑制侵襲及轉移的功效率指標。

接著利用傷口癒合分析及 Boyden chamber assay (Fig. 2 及 Fig. 3) 來觀察細胞的移動及侵襲能力，發現 chalcone 確實能有效地抑制膀胱癌細胞的侵襲及移動能力，而且當 T24 癌細胞處理 5 μ M 的 chalcone 即可抑制大約六成的侵襲能力。由上述的結果證實了 chalcone 的確具有抑制 T24 癌細胞的轉移能力，對日後針對膀胱癌細胞，或許可作為一種有效用藥。

當細胞進行轉移的時候，會分泌蛋白水解酵素去破壞細胞周邊的組織及細胞外基質 (ECM)，進而促使癌細胞可以轉移至其它組織器官 (Hussaini *et al.*, 2007)，過去文獻指出基質金屬蛋白水解酵素家族 (MMPs) 中的 MMP-2 及 MMP-9 會被大量表現在許多的惡性腫瘤中 (Johnsen *et al.*, 1998)。另有

文獻指出，利用雞胚胎絨毛膜試驗 (CAM assay) 發現 MMP-9 與 u-PA 皆有參與癌細胞的侵入作用，且缺少 MMP-9 或 u-PA 的癌細胞，其侵入的能力就會大大降低 (Kim *et al.*, 1998; Wilson and Chambers, 2004)。因此可以發現 MMP-2 及 MMP-9 的表現與癌細胞的侵襲及轉移具有高度的相關性 (Hao *et al.*, 2007; He *et al.*, 2007)。而 u-PA 為基質金屬蛋白水解酶的上游，與癌症的轉移有關 (Amir *et al.*, 2005)。本實驗透過 gelatin zymography、casein-plasminogen zymography 及 Western blotting 的分析方法分析 MMP-2、MMP-9 及 u-PA 的酵素活性。結果確實發現 T24 人類膀胱癌細胞在 chalcone 的處理之下，MMP-2、MMP-9 及 u-PA 的酵素活性有降低的情形 (Fig. 4 及 Fig. 5)。

除了上述討論 MMPs 的作用與其活化和抑制的機制外，MMPs 的表現還包括許多步驟，例如：與基因的調控、mRNA 的剪裁、穩定 mRNA 的機制以及蛋白質的修飾等。而在基因的調控方面，先前有研究指出，在不同 MMPs 的基因序列上有著不同的轉錄因子和結合位，當與轉錄因子結合之後會促進 MMPs 的表現 (Yan and Boyd, 2007)，而 u-PA 的基因表現也是影響這些蛋白表現量的重要關鍵 (Liu, 1999)。由先前的實驗結果得知 T24 人類膀胱癌細胞在處理 chalcone 之後，其 MMP-2、MMP-9 及 u-PA 的分泌量與蛋白量有明顯的變化。接著我們利用 polymerase chain reaction 的方式觀察其 mRNA level 的表現。其結果發現 chalcone 處理 T24 人類膀胱癌細胞後，MMP-2、MMP-9 及 u-PA 的 mRNA level 表現量有顯著的下降 (Fig. 6)。所以實驗證實了 chalcone 會影響細胞調控 MMP-2、MMP-9 及 u-PA 的轉錄作用，並且改變這些蛋白質的表現量。

過去的文獻顯示，MMPs 基因上的表現受到許多不同的訊息傳遞蛋白以及轉錄因子所調控 (Kajanne *et al.*, 2007; Palanki, 2002)。在 MAPK 訊息傳遞路徑中，已知當大鼠皮質受到物理性的刮傷時，活化的 p38 與 ERK 的路徑會去調控初代培養的星狀細胞 MMP-9 的表現 (Wang *et al.*, 2002)，肺癌細胞可藉由 ERK/Sp1 這條路徑增加 MMP-2 的表現 (Pan and Hung, 2002)。在 Jayasooriya 等人的研究中指出，甲醇萃 *Hydroclathrus clathratus* 透過抑制 MAPK pathways 及 NF- κ B 轉錄活性的表現，進而抑制 T24 膀胱癌細胞 MMP-9 的分泌 (Jayasooriya *et al.*, 2005)。而由 Noguchi 等人的研究結果中，得知 microRNA-143 和 microRNA-145 透過調節 PI3K/Akt 和 MAPK signaling pathways 來達到抑制人類膀胱癌細胞的生長 (Noguchi *et al.*, 2013)。在本研究中可以發現，chalcone 處理 T24 細胞後，ERK、p38、JNK 的磷酸化表現明顯減少 (Fig. 6)。

近來研究指出，調控人類癌症進程，除了 MAPK signaling 外還有 FAK 及 PI3K /Akt signaling，而活化 FAK 及 PI3K/Akt signaling 與許多癌症的侵入及轉移都有密切關係 (Kubiatowski *et al.*, 2001)。因此我們經由 (Fig. 6) 蛋白分析結果也發現，PI3K 的蛋白表現量與 FAK 及 Akt 的磷酸化表現皆會受到 chalcone 抑制。

接著我們以 ERK1/2 專一性的抑制劑 (U0126)、p38 專一性的抑制劑 (SB203580)、JNK1/2 專一性的抑制劑 (SP600125) 與 PI3K 專一性的抑制劑 (LY294002) 與 chalcone 處理 T24 膀胱癌細胞，進行 gelatin zymography 及 casein-plasminogen zymography 分別觀察細胞分泌 MMP-2、MMP-9 及 u-PA 的表現量，結果發現 (Fig.8-Fig.11) PI3K/Akt 和 MAPK signaling

pathways 可能為 chalcone 抑制 T24 細胞分泌 MMP-2、MMP-9 及 u-PA 的主要路徑。

過去的文獻顯示，MMP-2、MMP-9 mRNA 的表現需要 NF- κ B 的活化 (Peng *et al.*, 2006)，且 c-Jun、c-Fos 也被認為和調節腫瘤的進程及轉移有關 (Ding *et al.*, 1999)。經由 (Fig. 13 及 Fig. 14) 結果發現 T24 細胞受到 chalcone 刺激下，核蛋白和質蛋白中 NF- κ B、c-Jun 及 c-Fos 皆明顯降低。由此可知，chalcone 處理 T24 細胞後，可能是藉由 FAK、PI3K/Akt 和 MAPK pathway 影響下游蛋白質表現進而抑制 T24 細胞的侵襲與轉移。

有文獻也指出，small GTPase family 成員如：Ras、RhoA、RhoB、Cdc42、Rac-1 主要參與在細胞癌化、侵入及轉移的過程 (Khosravi *et al.*, 1995; Pruitt and Der, 2001; Westwick *et al.*, 1997; Whitehead *et al.*, 1998)。另外，有一篇文獻指出 RhoB 會增強前列腺癌細胞 DU145 的移動以及增加 MMP-1 的表現 (Misao *et al.*, 2010)。在本篇實驗中，由 Western blotting 結果發現 (Fig. 12)，chalcone 可以抑制 Ras、Rac-1、Cdc42、RhoA、RhoB 的蛋白表現量。綜合實驗結果，我們可以證明 chalcone 可能可以用來預防癌症的轉移。

第七章 結論

首先利用傷口癒合實驗及 Boyden chamber assay 證實 chalcone 可以抑制 T24 膀胱癌細胞的移動性及侵入性，並以 gelatin zymography、casein-plasminogen zymography 和 polymerase chain reaction 分析證 chalcone 可以抑制 MMP-2、MMP-9 及 u-PA 的活性及 messenger RNA 的表現，並以 Western blotting 分析發現，FAK、ERK1/2、p38、JNK1/2 及 Akt 的磷酸化表現皆會受到 chalcone 所抑制，並呈現 dose-dependent 現象，且透過專一性抑制劑的處理，顯示 chalcone 是透過抑制 ERK1/2、p38、JNK1/2 及 PI3K 進而抑制了 MMP-2、MMP-9 及 u-PA 的表現；另外在 small GTPase family 的蛋白表現量也會受到 chalcone 所抑制。綜合上述所有的實驗結果，chalcone 可能是透過 FAK/PI3K/Akt 和 FAK/MAPK signal pathway 來影響 MMP-2、MMP-9 及 u-PA 的分泌，最後抑制 T24 細胞的移動及侵襲。

第八章 參考文獻

- 江紀武。1990。拉漢藥用植物名稱和檢索手冊。中國醫藥科技出版社，北京。100。
- 沈百奎。2000。千禧年最具發展潛力的新興蔬菜。農業世界雜誌 198, 29-40。
- 余德發。2002。花蓮地區明日葉栽培技術。花蓮區農業專訊 40, 10-12。
- 馬場君江。2000。日本健康野菜明日葉。青春出版社，台北。19-53。
- 張玉芳。2001。明日葉品質管制方法之研究。中國醫藥學院中國藥學研究所藥學碩士論文。
- 許鈴宜、陳建仁。1999。膀胱癌之描述性流行病學、危險因子及遺傳易感受性。中華衛誌 18, 387-412.
- 楊文乾。2001。神奇草藥大圖鑒。林鬱文化出版社，台北。p:618-619。
- 劉增城。1999。訪傑出農友-劉欽輝先生談新興有機蔬菜明日葉之利用。苗栗區農業專訓 5, 16-18。
- 劉新裕、張同吳、徐原田。1998。新興保健植物明日葉之開發與利用。台灣省農業試驗所技術服務 33, 13-14。
- 劉新裕、林俊義、張成國。2001。藥用植物專輯。農試所特刊第 98 號。p:215-218。
- Aljada, A., Ghanim, H., Mohanty, P., Hofmeyer, D., Tripathy, D., and Dandona, P. (2001). Hydrocortisone suppresses intranuclear activator protein-1 (AP-1) binding activity in mononuclear cells and plasma matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9). The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism 86, 5988-5991.

- Alvarez, O.A., Carmichael, D.F., and DeClerck, Y.A. (1990). Inhibition of collagenolytic activity and metastasis of tumor cells by a recombinant human tissue inhibitor of metalloproteinases. *Journal of the National Cancer Institute* 82, 589-595.
- Amir, S., Margaryan, N.V., Otero-Marah, V., Khalkhali-Ellis, Z., and Hendrix, M.J. (2005). Maspin regulates hypoxia-mediated stimulation of uPA/uPAR complex in invasive breast cancer cells. *Cancer Biology & Therapy* 4, 400-406.
- Anderberg, C., Li, H., Fredriksson L., Andrae J., Betsholtz C., Li, X., Eriksson, U., and Pietras, K. (2009). Paracrine signaling by platelet-derived growth factor-CC promotes tumor growth by recruitment of cancer-associated fibroblasts. *Cancer Research* 69, 369-378.
- Bernards, R., and Weinberg, R.A. (2002). A progression puzzle. *Nature* 418, 823.
- Birkedal-Hansen, H. (1995). Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Current Opinion in Cell Biology* 17, 728-735.
- Boone, T.C., Johnson, M.J., De Clerck, Y.A., and Langley, K.E. (1990). cDNA cloning and expression of a metalloproteinase inhibitor related to tissue inhibitor of metalloproteinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 2800-2804.
- Chambers, A.F., and Matrisian, L.M. (1997). Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *Journal of the National Cancer*

Institute 89, 1260-1270.

Chan-Hui, P.Y., and Weaver, R. (1998). Human mitogen-activated protein kinase kinase kinase mediates the stress-induced activation of mitogen-activated protein kinase cascades. *Biochemical Journal* 336, 599-609.

De, C.Y., Szpirer, C., Aly, M.S., Cassiman, J.J., Eeckhout, Y., and Rousseau, G. (1992). The gene for tissue inhibitor of metallo-proteinases-2 is localized on human chromosome arm 17q25. *Genomics* 14, 782-784.

deKernion, J.B. (1977). The chemotherapy of advanced bladder carcinoma. *Cancer research* 8, 2771-2774.

deKernion, J.B., Huang, M.Y., Lindner, A., Smith, R.B., Kaufman, J.J. (1985). The management of superficial bladder tumors and carcinoma in situ with intravesical bacillus Calmette-Guerin. *The Journal of urology* 4, 598-601.

Dhanasekaran, D.N., and Johnson, G.L. (2007). MAPKs: function, regulation, role in cancer and therapeutic targeting. *Oncogene* 26, 3097-3099.

Ding, M., Shi, X., Dong, Z., Chen, F., Lu, Y., Castranova, V., and Vallyathan, V. (1999). Freshly fractured crystalline silica induces activator protein-1 activation through ERKs and p38 MAPK. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 30611-30616.

Felx, M., Guyot, M.C., Isler, M., Turcotte, R.E., Doyon, J., Khatib, A.M., Leclerc, S., Moreau, A., and Moldovan, F. (2006). Endothelin-1 (ET-1) promotes MMP-2 and MMP-9 induction involving the transcription factor NF-kappaB in human osteosarcoma. *Clinical Science (London,*

England: 1979) 110,645-654.

Flenniken, A.M., and Williams, B.R. (1990). Developmental expression of the endogenous TIMP gene and a TIMP-lacZ fusion gene in transgenic mice. *Genes & Development* 4, 1094-1106.

Flug, M., and Kopf, M.P. (1995). The basement membrane and its involvement in carcinoma cell invasion. *Acta Anatomica* 152, 69-84.

Friis-Moller, A., Chen, M., Fuursted, K., Christensen, S.B., and Kharazmi, A. (2002). In vitro antimycobacterial and antilegionella activity of licochalcon A from Chinese licorice roots. *Planta medica* 68, 416-419.

Fujita, T., Skuma, S., Sumiya, T., Nishida, H., Fujimoto, Y., Baba, K., and Kozawa, M. (1992). The effects of xanthoangelol E on arachidonic acid metabolism in the gastric antral mucosa and platelet of the rabbit. *Research communications in chemical pathology and pharmacology* 77, 227-240.

Gao, J., Chen, M., and Ren, H. (2005). Clinical effects of dendritic cells pulsed with autologous hepatoma cell lysates on the postoperative recurrence and metastasis of hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 13, 432-435.

Greene, J., Wang, M., Liu, Y. E., Raymond, L.A., Rosen, C., and Shi, Y.E. (1996). Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *Journal of Biological Chemistry* 271, 30375-30380.

- Han, B., Nakamura, M., Zhou, G., Ishii, A., Nakamura, A., Bai, Y., Mori, I., and Kakudo, K. (2006). Calcitonin inhibits invasion of breast cancer cells: involvement of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and uPA receptor. *International Journal of Oncology* 28, 807-814.
- Hao, L., Zhang, C., Qiu, Y., Wang, L., Luo, Y., Jin, M., Zhang, Y., Guo, T. B., and Matsushima, K. (2007). Recombination of CXCR4, VEGF, and MMP-9 predicting lymph node metastasis in human breast cancer. *Cancer Letters* 253, 34-42.
- He, C.S., Wilhelm, S.M., Pentland, A.P., Marmer, B.L., Grant, G.A., Eisen, A.Z., and Goldberg, G.I. (1989). Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 2632-2636.
- He, Y., Liu, X.D., Chen, Z.Y., Zhu, J., Xiong, Y., Li, K., Dong, J.H., and Li, X. (2007). Interaction between Cancer Cells and Stromal Fibroblasts Is Required for Activation of the uPAR-uPA-MMP-2 Cascade in Pancreatic Cancer Metastasis. *Clinical Cancer Research* 13, 3115-3124.
- Hofmann, G.E., Glatstein, I., Schatz, F., Heller, D., and Deligdisch, L. (1994). Immunohistochemical localization of urokinase-type plasminogen activator and the plasminogen activator inhibitors 1 and 2 in early human implantation sites. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 170, 671-676.

- Hussaini, I.M., Trotter, C., Zhao, Y., Abdel-Fattah, R., Amos, S., Xiao, A., Agi, C.U., Redpath, G.T., Fang, Z., Leung, G.K., Lopes, M.B., and Laws, E.R., Jr. (2007). Matrix metalloproteinase-9 is differentially expressed in nonfunctioning invasive and noninvasive pituitary adenomas and increases invasion in human pituitary adenoma cell line. *The American Journal of Pathology* 170, 356-365.
- Hynes, R.O. (2003). Metastatic potential: generic predisposition of the primary tumor or rare, metastatic variants-or both? *Cell* 113, 821-823
- Inamori, Y., Baba, K., Tsujibo, H., Taniguchi, M., Nakata, K., and Kozawa, M. (1991). Antibacterial activity of two chalcones, xanthoangelol and 4-hydroxyderricin, isolated from the root of *Angelica keiskei* Koidzumi. *Chemical & pharmaceutical bulletin* 39, 1604-1605.
- Ito, Y., Tomoda, C., Uruno, T., Takamura, Y., Miya, A., Kobayashi, K., Matsuzuka, F., Kuma, K., and Miyauchi, A. (2004). Preoperative ultrasonographic examination for lymph node metastasis: usefulness when designing lymph node dissection for papillary microcarcinoma of the thyroid. *World journal of surgery* 28, 498-501.
- Iwamura, C., Shinoda, K., Yoshimura, M., Watanabe, Y., Obata, A., and Nakayama, T. (2010). Naringenin chalcone suppresses allergic asthma by inhibiting the type-2 function of CD4 T cells. *Allergology international: official journal of the Japanese Society of Allergology* 59, 67-73.

Jayasooriya, R.G., Choi, Y.H., Moon, S.K., Kim, W.J., and Kim, G.Y. (2012).

Methanol extract of *Hydroclathrus clathratus* suppresses matrix metalloproteinase-9 in T24 bladder carcinoma cells by suppressing the NF- κ B and MAPK pathways. *Oncology reports* 27, 541-546.

Johnsen, M., Lund, L.R., Romer, J., Almholt, K., and Dano, K. (1998). Cancer invasion and tissue remodeling: common themes in proteolytic matrix degradation. *Current Opinion in Cell Biology* 10, 667-671.

Johnson, G.L., and Lapadat, R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298, 1911-1912.

Johnson, M.D., Kim, H.R., Chesler, L., Tsao-Wu, G., Bouck, N., and Polverini, P.J. (1994). Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase. *Journal of Cellular Physiology* 160, 194-202.

Kajanne, R., Miettinen, P., Mehlem, A., Leivonen, S.K., Birrer, M., Foschi, M., Kahari, V.M., and Leppa, S. (2007). EGF-R regulates MMP function in fibroblasts through MAPK and AP-1 pathways. *Journal of Cellular Physiology* 212, 489-497.

Kandel, E.S., and Hay, N. (1999). The regulation and activities of the multi-functional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Experimental Cell Research* 253, 210-29.

Kapeller, R., Prasad, K.V., Janssen, O., Hou, W., Schaffhausen, B.S., Rudd, C.E., and Cantley, L.C. (1994). Identification of two SH3-binding

- motifs in the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. *The Journal of Biological Chemistry* **269**, 1927-1933.
- Khosravi, F.R., Solski, P.A., Clark, G.J., Kinch, M.S., and Der, C.J. (1995). Activation of Rac1, RhoA, and mitogen-activated protein kinases is required for Ras transformation. *Molecular and cellular biology* **15**, 6443-6453.
- Kim, D., Kim, S., Koh, H., Yoon, S.O., Chung, A.S., Cho, K.S., and Chung, J. (2001). Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production. *The FASEB Journal* **15**, 1953-1962.
- Kim, J., Yu, W., Kovalski, K., and Ossowski, L. (1998). Requirement for specific proteases in cancer cell intravasation as revealed by a novel semi-quantitative PCR-based assay. *Cell* **94**, 353-362.
- Kimura, Y., and Baba, K. (2003). Antitumor and antimetastatic activities of *Angelica keiskei* roots, part 1: Isolation of an active substance, xanthoangelol. *International journal of cancer* **106**, 429-437.
- Kimura, Y., Taniguchi, M., and Baba, K. (2004). Antitumor and antimetastatic activities of 4-hydroxyderricin isolated from *Angelica keiskei* roots. *Planta medica* **70**, 211-219.
- Kolkenbrock, H., Orgel, D., Hecker-Kia, A., Zimmermann, J., and Ulbrich, N. (1995). Generation and activity of the ternary gelatinase B / TIMP- 1 / LMW-stromelysin-1 complex. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* **376**, 495-500.

- Kubiatowski, T., Jang, T., Lachyankar, M. B., Salmonsens, R., Nabi, R.R., Quesenberry, P.J., Litofsky, N.S., Ross, A.H., and Recht, L.D. (2001). Association of increased phosphatidylinositol 3-kinase signaling with increased invasiveness and gelatinase activity in malignant gliomas. *Journal of Neurosurgery* 95, 480-488.
- Kyriakis, J.M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E.A., Ahmad, M.F., Avruch, J., and Woodgett, J.R. (1994). The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 369, 156-160.
- Lee, Y.H., Jeon, S.H., Kim, S.H., Kim, C., Lee, S.J., Koh, D., Lim, Y., Ha, K., and Shin, S.Y. (2012). A new synthetic chalcone derivative, 2-hydroxy-3',5,5'-trimethoxychalcone (DK-139), suppresses the Toll-like receptor 4-mediated inflammatory response through inhibition of the Akt/NF- κ B pathway in BV2 microglial cells. *Experimental & molecular medicine* 44, 369-377.
- Liabakk, N.B., Talbot, I., Smith, R.A., Wilkinson, K., and Balkwill, F. (1996). Matrix metalloprotease 2 (MMP-2) and matrix metalloprotease 9 (MMP-9) type IV collagenases in colorectal cancer. *Cancer Research* 56, 190-196.
- Lin, E., Lin, W.H., Wang, S.Y., Chen, C.S., Liao, J.W., Chang, H.W., Chen, S.C., Lin, K.Y., Wang, L., Yang, H.L., and Hseu, Y.C. (2012). Flavokawain B inhibits growth of human squamous carcinoma cells: Involvement of apoptosis and cell cycle dysregulation in vitro and in

- vivo. *The Journal of nutritional biochemistry* 23, 368-378.
- Lin, Y.M., Zhou, Y., Flavin, M.T., Zhou, L.M., Nie, W., and Chen, F.C. (2002). Chalcones and flavonoids as antituberculosis agents. *Bioorganic & medicinal Chemistry* 10, 2795-2802.
- Liu, M., Wilairat, P., Croft, S.L., Tan, A.L., and Go, M.L. (2003). Structure-activity relationships of antileishmanial and antimalarial chalcones. *Bioorganic & medicinal chemistry* 11, 2729-2738.
- Liu, X.F., Zheng, C.J., Sun, L.P., Liu, X.K., and Piao, H.R. (2011). Synthesis of new chalcone derivatives bearing 2,4-thiazolidinedione and benzoic acid moieties as potential anti-bacterial agents. *European journal of medicinal chemistry* 46, 3469-3473.
- Liu, Y.X. (1999). Regulation of the plasminogen activator system in the ovary. *Biological signals and receptors* 8, 160-177.
- Maioral, M.F., Gaspar, P.C., Rosa-Souza, G.R., Mascarello, A., Chiaradia, L. D., Licínio, M.A., Moraes, A.C., Yunes, R.A., Nunes, R.J., and Santos-Silva, M.C. (2012). Apoptotic events induced by synthetic naphthylchalcones in human acute leukemia cell lines. *Biochimie* 12, 477-484.
- May, F., Schlenker, B., Hofer, B., Stief, C.G., and Rau, H.G. (2013). Laparoscopic repair of iatrogenic bladder perforation during transurethral bladder tumor resection: Case report and literature review. *Indian journal of urology* 1, 61-63.

- Misao, Y., Yoshifumi, S.H., Atsuyuki, O., Katsunori, U., Daisuke, K., Masatoshi, W., Toyoharu, Y., Taizo, S., and Shinya, W. (2010). RhoB enhances migration and MMP1 expression of prostate cancer DU145. *Experimental and Molecular Pathology* 88, 90-95.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65, 55-63.
- Murphy-G, K.V. (1997). Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the "hemopexin" domain?. *Matrix Biology* 15, 511-518.
- Nabeshima, K., Inoue, T., Shimao, Y., and Sameshima, T. (2002). Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. *Pathology International* 52, 255-264.
- Nagase, H. (1997). Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biological Chemistry* 378, 151-160.
- Nagase, H., and Woessner, J.F. (1999). Matrix metalloproteinases. *Journal of Biological Chemistry* 274, 21491-21494.
- Nelson, A.R., Fingleton, B., Rothenberg, M.L., and Matrisian, L.M. (2000). Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *Journal of Clinical Oncology* 18, 1135-1149.
- Noguchi, S., Yasui, Y., Iwasaki, J., Kumazaki, M., Yamada, N., Naito, S., and Akao, Y. (2013). Replacement treatment with microRNA-143 and -145 induces synergistic inhibition of the growth of human bladder cancer cells

- by regulating PI3K/Akt and MAPK signaling pathways. *Cancer letters* 28, 353-61.
- Ohuchi, E., Imai, K., Fujii, Y., Sato, H., Seiki, M., and Okada, Y. (1997). Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *The Journal Biological Chemistry* 272, 2246-2251.
- Okamoto, R., and Watanabe, M. (2003). Manipulating the differentiation and regeneration of the gastrointestinal epithelia--prospects for clinical application. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 100, 1369-1374.
- Olaso, E., Labrador, J.P., Wang, L., Ikeda, K., Eng, F.J., Klein, R., Lovett, D.H., Lin, H.C., and Friedman, S.L. (2002). Discoidin domain receptor 2 regulates fibroblast proliferation and migration through the extracellular matrix in association with transcriptional activation of matrix metalloproteinase-2. *The Journal of biological chemistry* 277, 3606-3613.
- Palanki, M.S. (2002). Inhibitors of AP-1 and NF-kappa B mediated transcriptional activation: therapeutic potential in autoimmune diseases and structural diversity. *Current Medicinal Chemistry* 9, 219-227.
- Pan, M.R., and Hung, W.C. (2002). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit matrix metalloproteinase-2 via suppression of the ERK/Sp1-mediated transcription. *Journal of Biological Chemistry* 277, 32775-32780.
- Park, B.K., Zeng, X., and Glazer, R.I. (2001). Akt1 induces extracellular

- matrix invasion and matrix metalloproteinase-2 activity in mouse mammary epithelial cells. *Cancer Research* 61, 7647-7653.
- Peng, P.L., Hsieh, Y.S., Wang, C.J., Hsu, J.L., and Cho, F.P. (2006). Inhibitory effect of berberine on the invasion of human lung cancer cells via decreased productions of urokinase-plasminogen activator and matrix metalloproteinase-2. *Toxicology and Applied Pharmacology* 214, 8-15.
- Philip, S., Bulbule, A., and Kundu, G.C. (2001). Osteopontin stimulates tumor growth and activation of promatrix metalloproteinase-2 through nuclear factor-kappa B-mediated induction of membrane type 1 matrix metalloproteinase in murine melanoma cells. *Journal of Biological Chemistry* 276, 44926-44935.
- Pointon, R.C. (1973). Cancer of the bladder: achievements and limitations of radiotherapy. *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 3, 289.
- Pruitt, K., and Der, C.J. (2001). Ras and Rho regulation of the cell cycle and oncogenesis. *Cancer letters* 171, 1-10.
- Quemener, C., Gabison, E.E., Naimi, B., Lescaille, G., Bougatef, F., Podgorniak, M.P., Labarchede, G., Lebbe, C., Calvo, F., Menashi, S., and Mourah, S. (2007). Extracellular matrix metalloproteinase inducer up-regulates the urokinase-type plasminogen activator system promoting tumor cell invasion. *Cancer Research* 67, 9-15.
- Robinson, M.J., and Cobb, M.H. (1997). Mitogen-activated protein kinase pathways. *Current Opinion Cell Biology* 9, 180-186.

- Romer, J., Bugge, T.H., Pyke, C., Lund, L.R., Flick, M.J., Degen, J.L., and Dano, K. (1996). Impaired wound healing in mice with a disrupted plasminogen gene. *Nature Medicine* 2, 287-292.
- Shapiro S.D. (1998). Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. *Current Opinion Cell Biology* 10, 602-608.
- Sliva, D., Rizzo, M.T., and English, D. (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase and NF-kappa B regulate motility of invasive MDA-MB-231 human breast cancer cells by the secretion of urokinase-type plasminogen activator. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 3150-3157.
- Stadherim, T.A., and Kucera, G.L. (1998). Extracellular signal-regulated kinase (ERK) activity is required for TPA-mediated inhibition of drug-induced apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 245, 266-271.
- Steeg, P.S. (2003). Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. *Nature Reviews Cancer* 3, 55-63.
- Stetler-Stevenson, W.G., Brown, P.D., Onisto, M., Levy, A.T., and Liotta, L.A. (1990). Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) mRNA expression in tumor cell lines and human tumor tissues. *The Journal of Biological Chemistry* 265, 13933-13938.
- Suthiphongchai, T., Phimsen, S., Sakulkhu, U., and Tohtong, R. (2006). PD98059-inhibited invasion of Dunning rat prostate cancer cells

involves suppression of motility but not MMP-2 or uPA secretion.

Oncology Reports 15, 1605-1610.

Tournier, C., Hess, P., Yang, D.D., Xu, J., Turner, T.K., Nimnual, A., Bar-Sagi, D., Jones, S.N., Flavell, R.A., and Davis, R.J. (2000). Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* 288, 870-874.

Tryggvason, K., Hoyhtya, M., and Pyke, C. (1993). Type IV collagenase in invasion and metastasis. *Breast Cancer Research and Treatment* 24, 209-218.

Vogel, S., Barbic, M., Jürgenliemk, G., and Heilmann, J. (2010). Synthesis, cytotoxicity, anti-oxidative and anti-inflammatory activity of chalcones and influence of A-ring modifications on the pharmacological effect. *European journal of medicinal chemistry* 45, 2206-2213.

Wang, X., Mori, T., Jung, J.C., Fini, M.E., and Lo, E.H. (2002). Secretion of matrix metalloproteinase-2 and -9 after mechanical trauma injury in rat cortical cultures and involvement of MAP kinase. *Journal of Neurotrauma* 19, 615-625.

Wang, Y., Chen, Y., Wang, J., Chen, J., Aggarwal, B.B., Pang, X., and Liu, M. (2012). Xanthohumol, a prenylated chalcone derived from hops, suppresses cancer cell invasion through inhibiting the expression of CXCR4 chemokine receptor. *Current molecular medicine* 12, 153-162.

Welch, D.R., Sakamaki, T., Pioquinto, R., Leonard, T.O., Goldberg, S.F., Hon,

- Q., Erikson, R.L., Rieber, M., Rieber, M.S., Hicks, D.J., Bonventre, J. V., and Alessandrini, A. (2000). Transfection of constitutively active mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase confers tumorigenic and metastatic potentials to NIH3T3 cells. *Cancer Research* 60, 1552-1556.
- Welham, M.J., Dechert, U., Leslie, K.B., Jirik, F., and Schrader, J.W. (1994). Interleukin (IL)-3 and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, but not IL-4, induce tyrosine phosphorylation, activation, and association of SHPTP2 with Grb2 and phosphatidylinositol 3'-kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 269, 23764-23768.
- Westermarck, J., and Kahari, V.M. (1999). Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *The FASEB Journal* 13, 781-792.
- Westwick, J.K., Lambert, Q.T., Clark, G.J., Symons, M., Van, A.L., Pestell, R.G., and Der, C.J. (1997). Rac regulation of transformation gene expression, and action organization by multiple, PAK-independent pathways. *Molecular and cellular biology* 17, 1324-1335.
- Whitehead, I.P., Abe, K., Gorski, J.L., and Der, C.J. (1998). CDC42 and FGD1 cause distinct signaling and transforming activities. *Molecular and cellular biology* 18, 4689-4697.
- Wick, M., Burger, C., Brusselbach, S., Lucibello, F.C., and Muller, R. (1994). A novel member of human tissue inhibitor of metalloproteinases

- (TIMP) gene family is regulated during G1 progression, mitogenic stimulation, differentiation, and senescence. *The Journal of Biological Chemistry* 269, 18953-18960.
- Wilson, S.M., and Chambers, A.F. (2004). Experimental metastasis assays in the chick embryo. *Current protocols in cell biology* 19,19.
- Woessner, J.F. (1991). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *The FASEB Journal* 5, 2145-2154.
- Yamamoto, T., Hagiwara, M., Nakazono, M., and Yamamoto, H. (1990). Intravesical bacillus Calmette-Guerin (BCG) in the treatment of superficial bladder cancer. Prospective randomized study for prophylactic effect. *Nihon Hinyōkika Gakkai zasshi.* 7, 997-1001.
- Yan, C., and Boyd, D.D. (2007). Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *Journal of cellular physiology* 211, 19-26.
- Yang, T.T., and Hawkes, S.P. (1992). Role of the 21-kDa protein TIMP-3 in oncogenic transformation of cultured chicken embryo fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 10676-18680.
- Yoshida, M., Korfhagen, T.R., and Whitsett, J.A. (2001). Surfactant protein D regulates NF-kappa B and matrix metalloproteinase production in alveolar macrophages via oxidant-sensitive pathways. *Journal of Immunology* 166, 7514-7519.
- Zaak D. (2003). Your patient with carcinoma of the urinary bladder. Options for organ preservation. *MMW Fortschritte der Medizin* 5, 28-32.

Zhao, S., Ma, C.M., Liu, C.X., Wei, W., Sun, Y., Yan, H., and Wu, Y.L.
(2012). Autophagy inhibition enhances isobavachalcone-induced cell
death in multiple myeloma cells. *International journal of molecular
medicine* 30, 939-944.



第九章 圖表與圖表說明

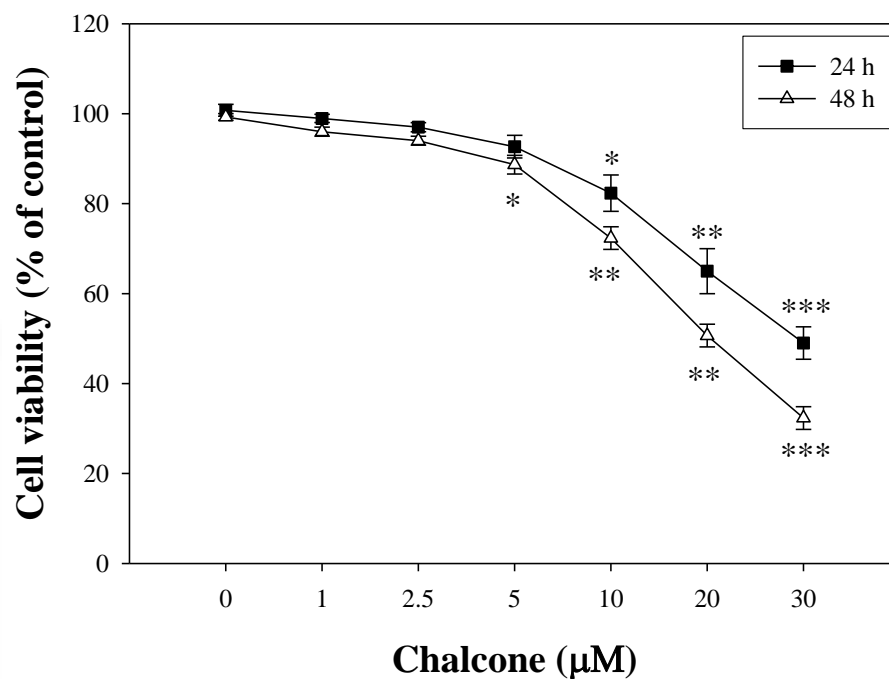
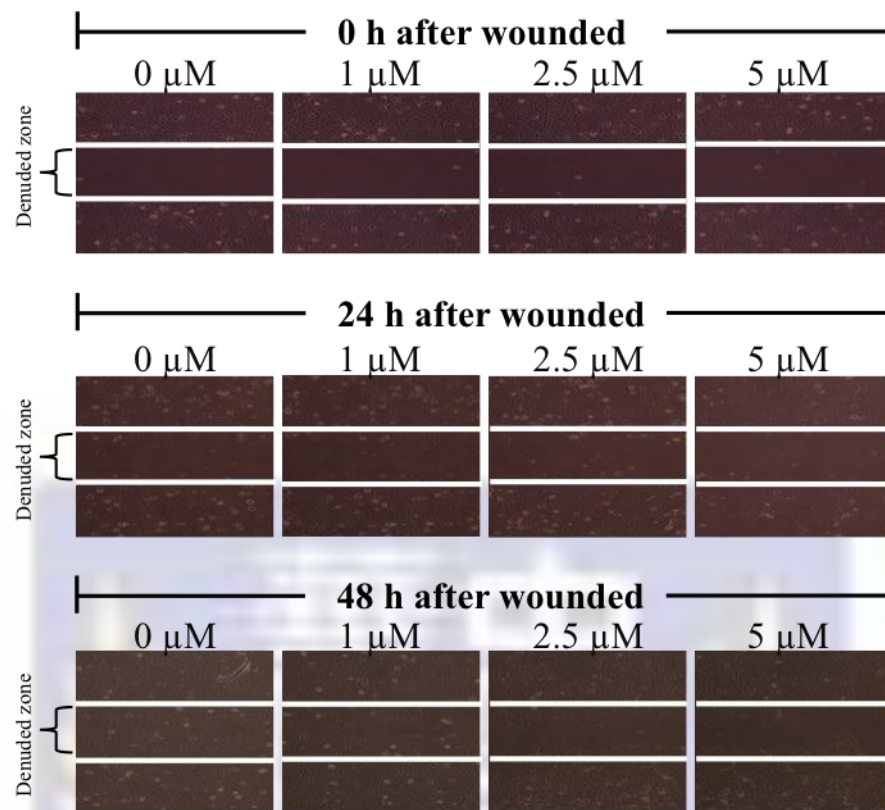


Fig. 1. Effect of chalcone on the viability of T24 cells. T24 cells (4×10^4 cells/well) were treated with various concentrations (0, 1, 2.5, 5, 10, 20 and 30 μM) of chalcone for 24 and 48 h. Cell viability was determined by MTT assay. Values are expressed as mean \pm SD of three independent experiments; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with the control.

(A)



(B)

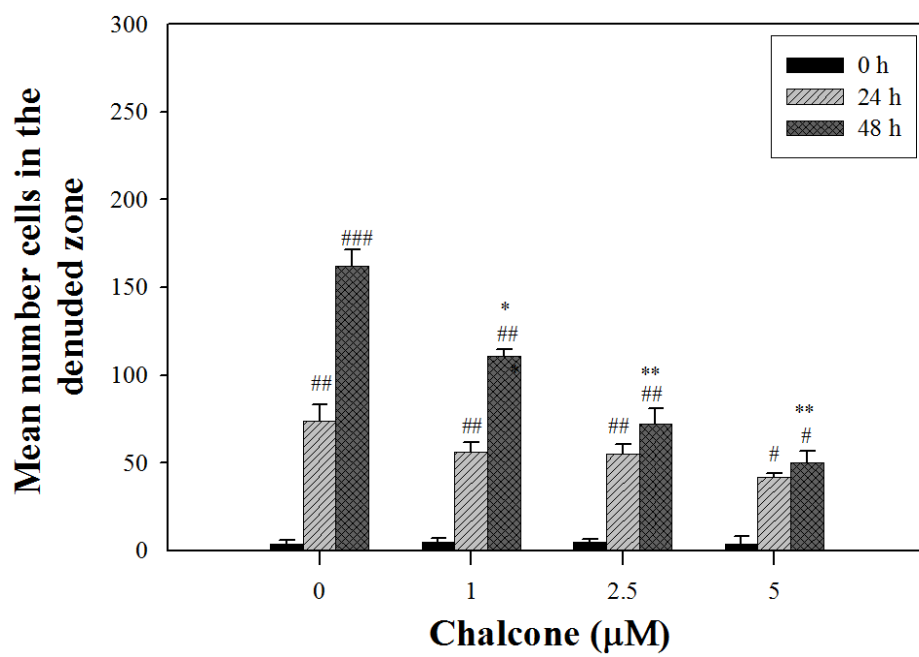
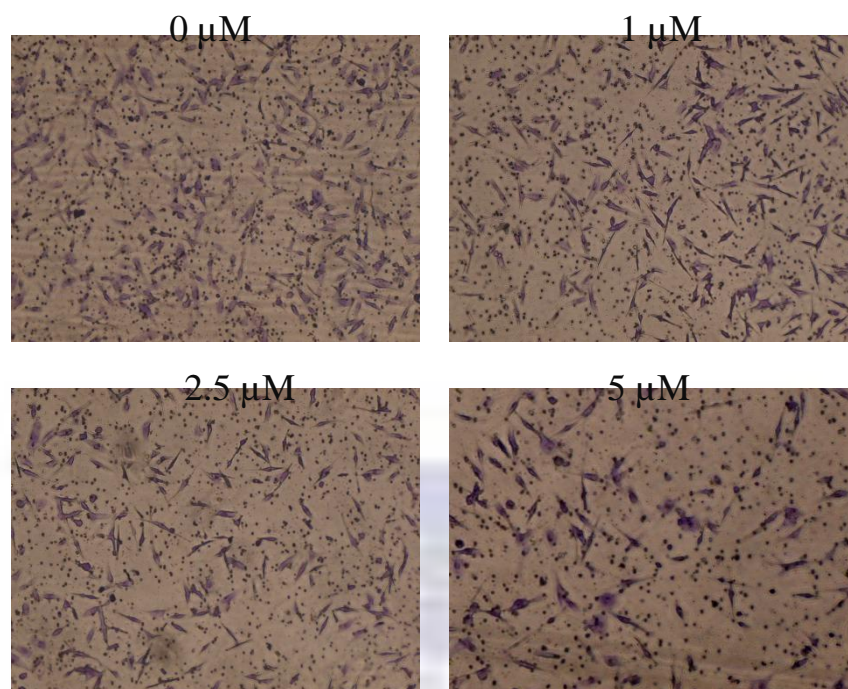


Fig. 2. Effect of chalcone on the migration of T24 cells. (A) T24 cells were treated with 0, 1, 2.5 and 5 μ M of chalcone, were scraped and the number of cells in the denuded zone (e.g., wound) was quantitated after 0, 24 and 48 h by inverted microscopy. White lines indicate the wound edge. (B) Quantitative assessment of the mean number of cells in the denuded zone and represents the average of three independent experiments \pm SD. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 compared with the control. # p <0.05, ## p <0.01, ### p <0.001 compared with the 0 h-treated time.



(A)



(B)

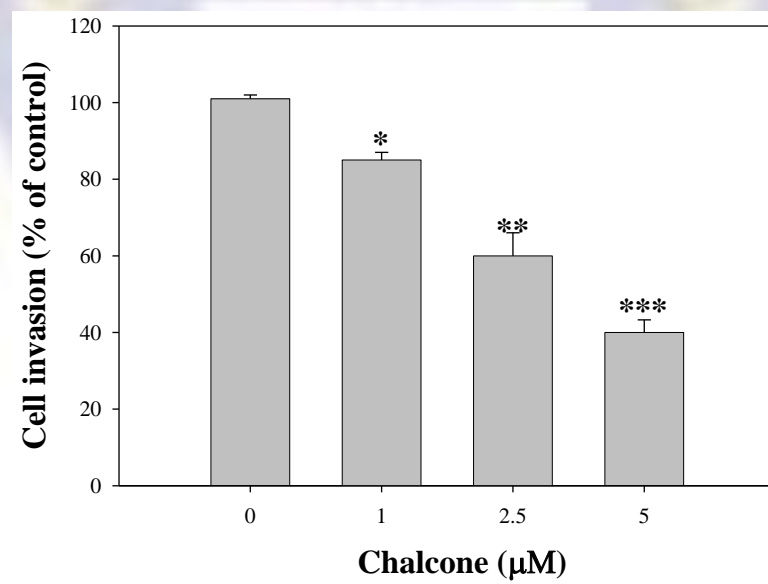


Fig. 3. Effect of chalcone on invasion of T24 cells. (A) T24 cells were treated with 0, 1, 2.5 and 5 μ M of chalcone for 24 h. Cell invasion were measured by Boyden chamber for 8 h ; upper chamber were precoated with matrigel. (B) Invasion ability of T24 cells were quantified by counting the number of cells that invaded to the underside of the porous polycarbonate membrane under microscopy and represent the average of three experiments \pm SD. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 compared with the control.



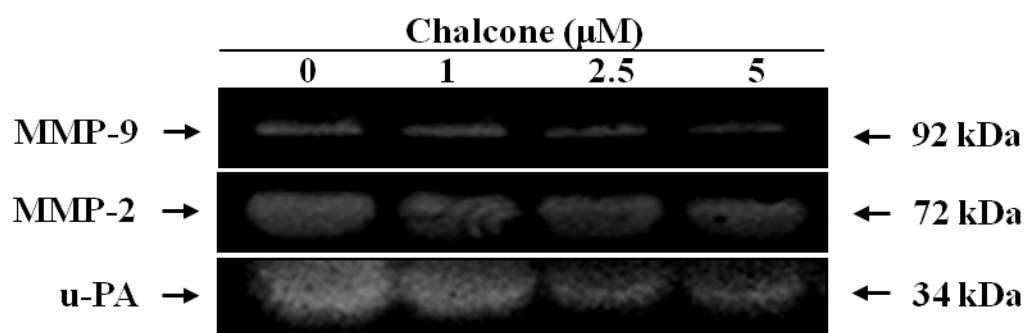


Fig. 4. Effect of chalcone on secreted MMP-2/MMP-9 and u-PA. T24 cells were treated with 0, 1, 2.5 and 5 μM of chalcone for 24 h. The conditioned media were collected and MMP-2/MMP-9 activity were determined by gelatin zymography and u-PA activity were determined by casein-plasminogen zymography.

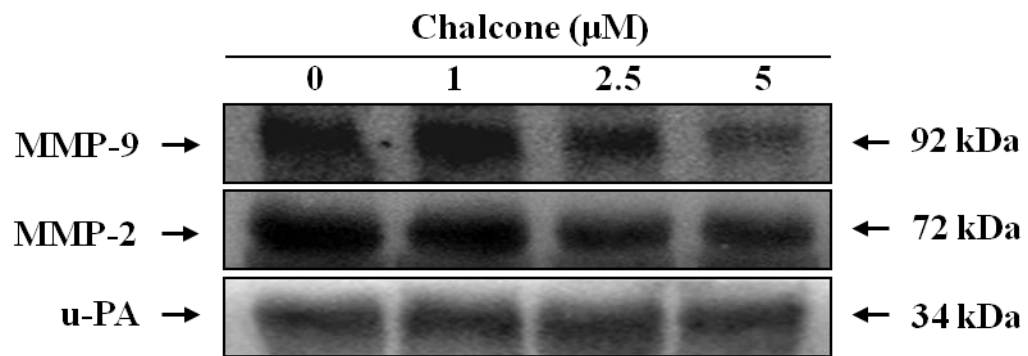


Fig. 5. Effect of chalcone on T24 MMP-2, MMP-9 and u-PA expression. T24 cells were treated with 0, 1, 2.5 and 5 μ M of chalcone for 24 h. Activity of MMP-2, MMP- 9 and u-PA were analyzed by Western blotting with antibodies as indicated.

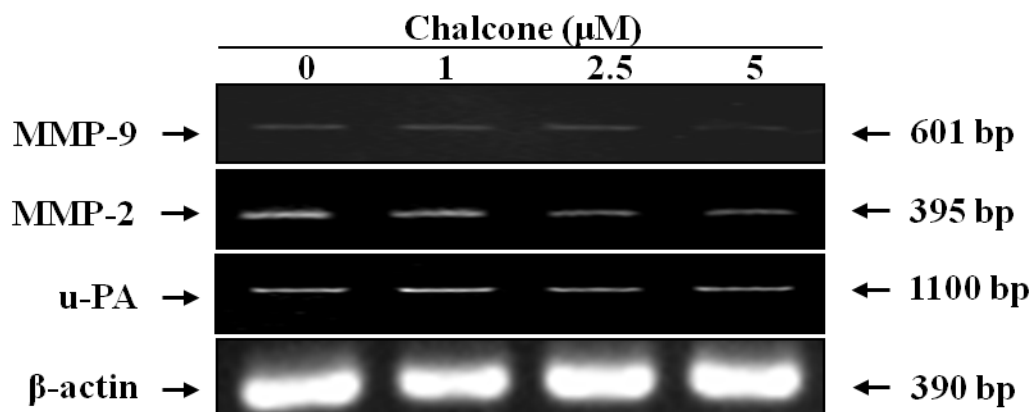


Fig. 6. Effect of chalcone on MMP-2, MMP-9 and u-PA mRNA expressions in T24 cells. Cells were treated with 0, 1, 2.5 and 5 μ M of chalcone for 12 h. Latter, DNA samples were extracted and subjected to a PCR and DNA electrophoresis for MMP-2, MMP-9 and u-PA with β -actin being an internal control.

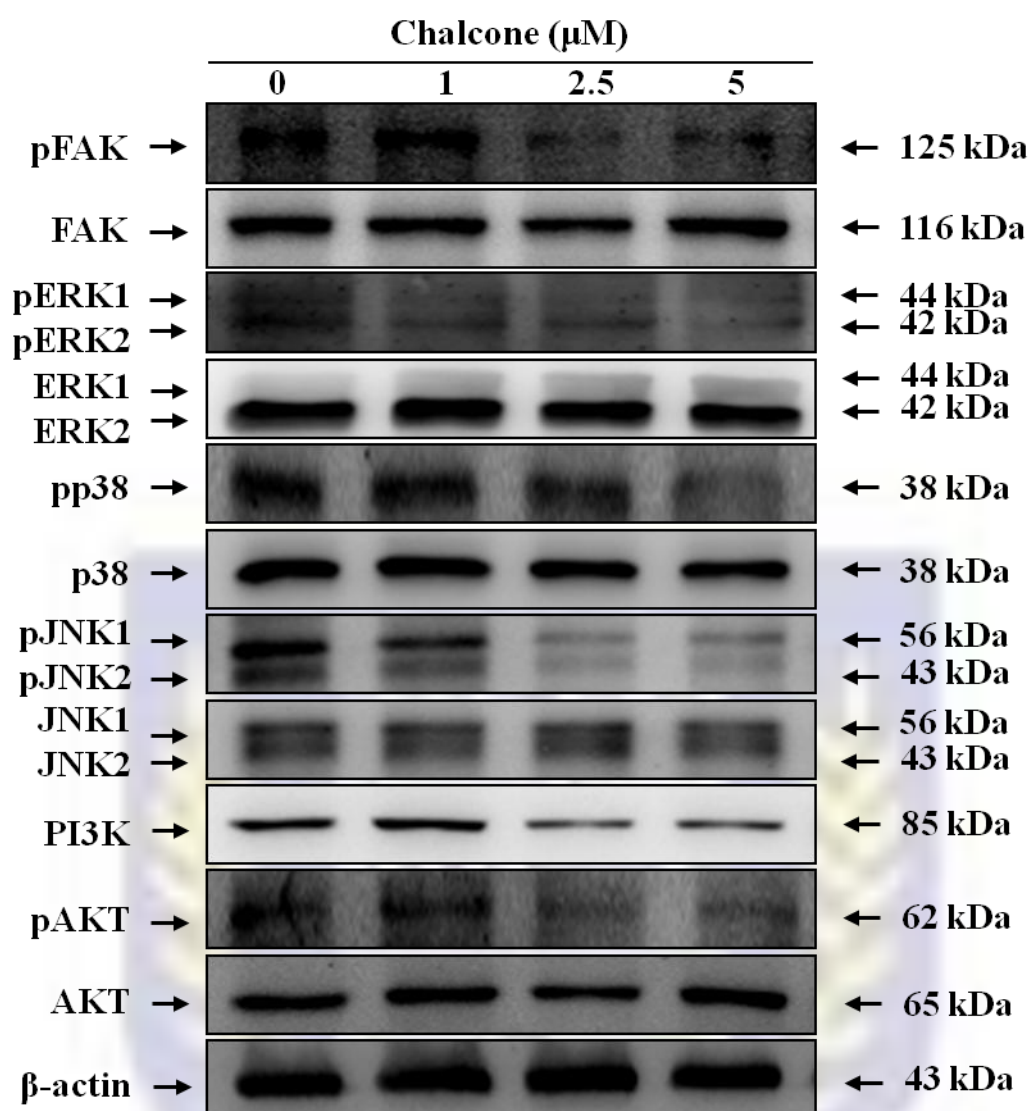


Fig. 7. Effects of chalcone on the phosphorylation of FAK, ERK, p38, JNK, Akt and PI3K. T24 cells were treated with 0, 1, 2.5 and 5 μ M of chalcone for 24 h. Protein level of FAK phosphorylation, FAK, ERK phosphorylation, ERK, p38 phosphorylation, p38, JNK phosphorylation, JNK, Akt phosphorylation, Akt and PI3K were analyzed by Western blotting. β -actin as an internal control.

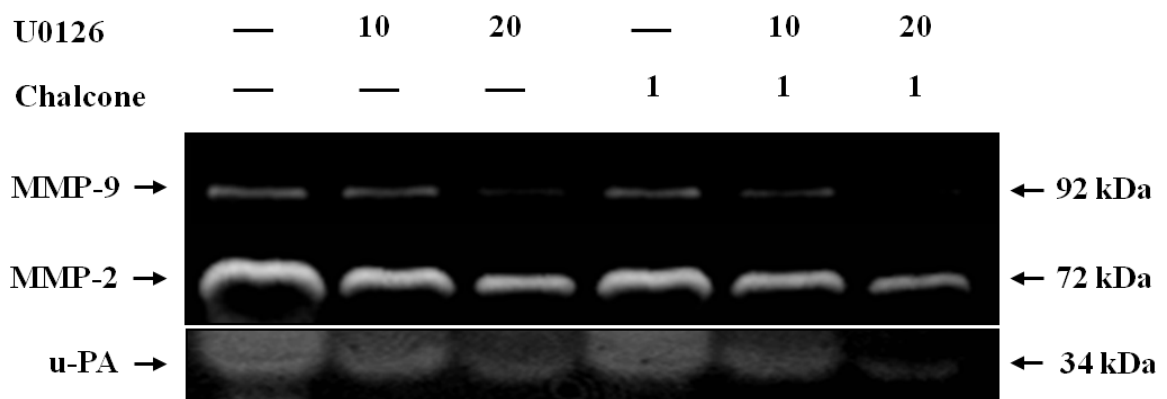


Fig. 8. Effects of ERK inhibitor (U0126) and chalcone on MMP-2/MMP-9 and u-PA secretion. T24 cells were seeded onto 6-well plates and pre-treated with U0126 (10 or 20 μ M) for 30 min and then incubated in the presence or absence of chalcone (1 μ M) for 24 h. Afterwards, the culture medium were subjected to gelatin and casein-plasminogen zymography to analyze the activity of MMP-2/ MMP-9 and u-PA.

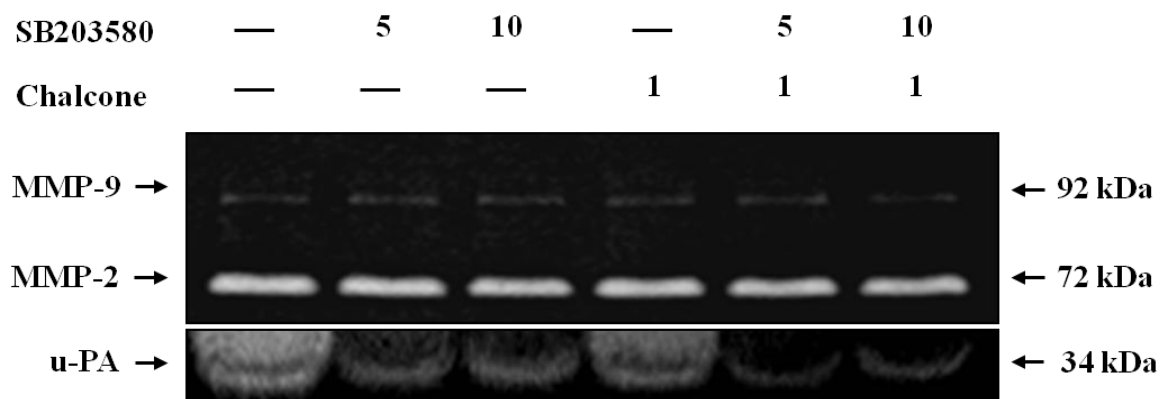


Fig. 9. Effects of p38 inhibitor (SB203580) and chalcone on MMP-2/MMP-9 and u-PA secretion. T24 cells were seeded onto 6-well plates and pre-treated with SB203580 (5 or 10 μ M) for 30 min and then incubated in the presence or absence of chalcone (1 μ M) for 24 h. Afterwards, the culture medium were subjected to gelatin and casein-plasminogen zymography to analyze the activity of MMP-2/MMP-9 and u-PA.

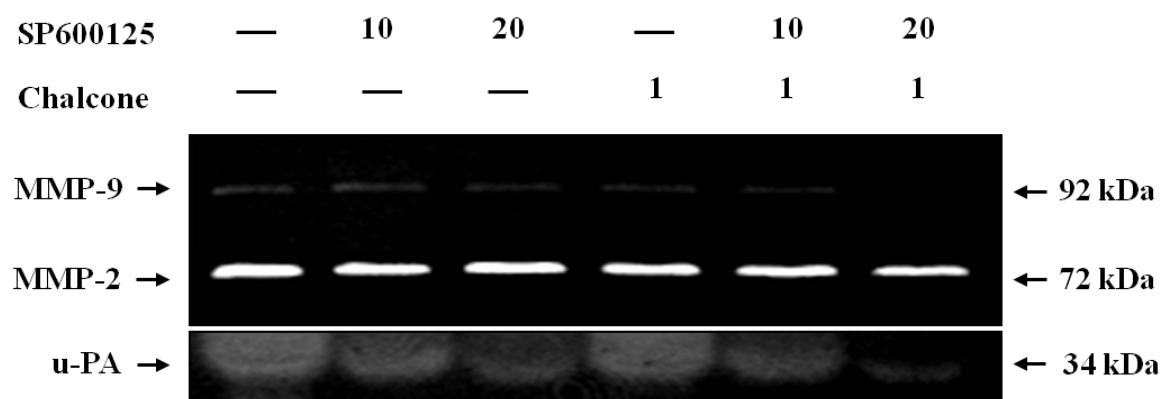


Fig. 10. Effects of JNK inhibitor (SP600125) and chalcone on MMP-2/MMP-9 and u-PA secretion. T24 cells were seeded onto 6-well plates and pre-treated with SP600125 (10 or 20 μ M) for 30 min and then incubated in the presence or absence of chalcone (1 μ M) for 24 h. Afterwards, the culture medium were subjected to gelatin and casein-plasminogen zymography to analyze the activity of MMP-2/MMP-9 and u-PA.

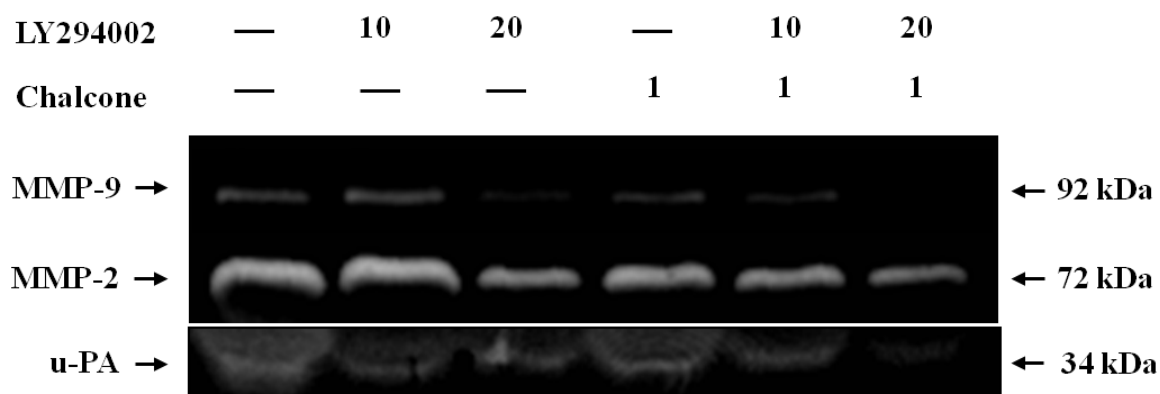


Fig. 11. Effects of PI3K inhibitor (LY294002) and chalcone on MMP-2/ MMP-9 and u-PA secretion. T24 cells were seeded onto 6-well plates and pre-treated with LY294002 (10 or 20 μ M) for 30 min and then incubated in the presence or absence of chalcone (1 μ M) for 24 h. Afterwards, the culture medium were subjected to gelatin and casein-plasminogen zymography to analyze the activity of MMP-2/MMP-9 and u-PA.

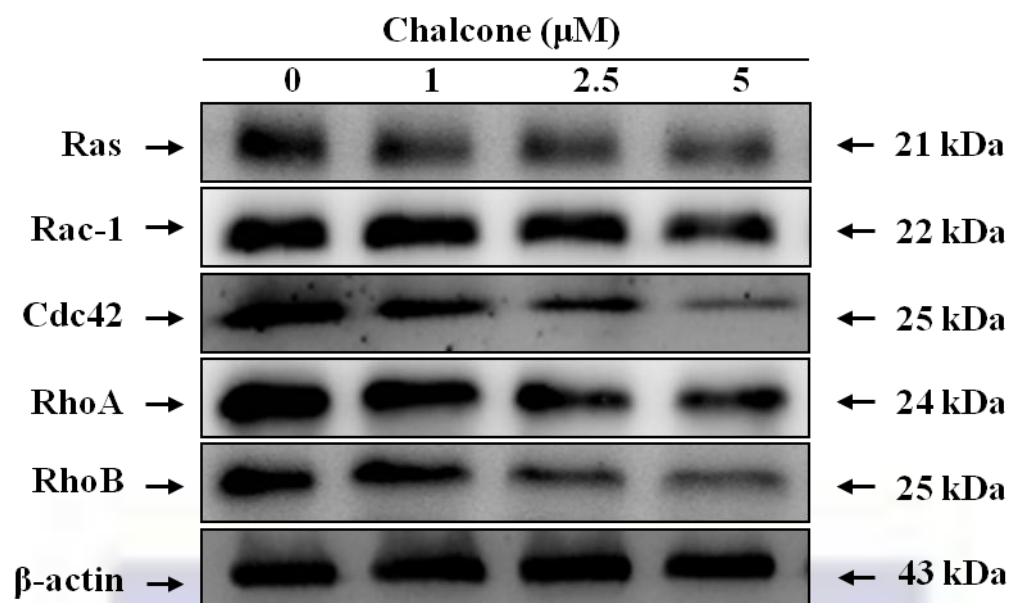


Fig. 12. Effects of chalcone on the protein expression level of small GTPases family (Ras, Rac-1, Cdc42, RhoA and RhoB). T24 cells were treated with with 0,1, 2.5, and 5 μ M of chalcone for 24 h. The expression of Ras, Rac-1, Cdc42, RhoA and RhoB were analyzed by Western blotting. β -actin as an internal control.

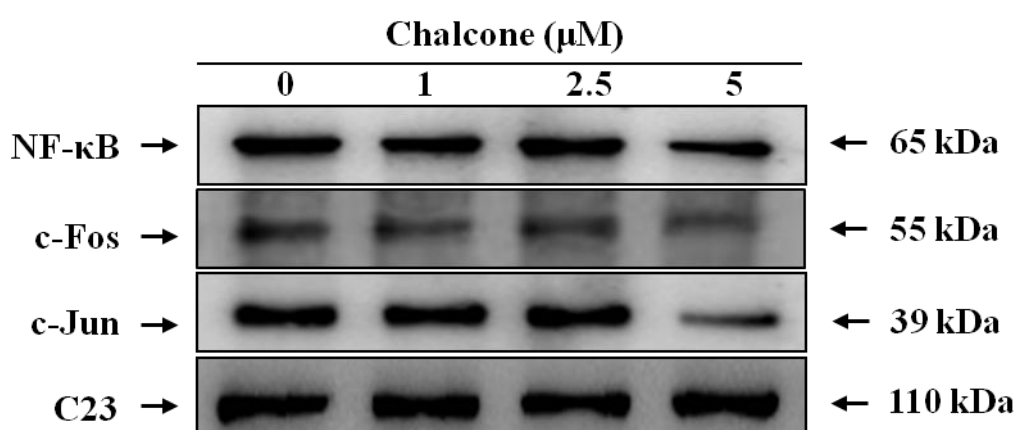


Fig. 13. Effects of chalcone on T24 NF- κ B, c-Fos and c-Jun expression.

Nuclear extracts were prepared from T24 cells that treated with 0, 1, 2.5 and 5 μ M of chalcone for 24 h, and then used to analyze nuclear extracts were subjected to SDS-PAGE followed by Western blotting with anti-NF- κ B, anti-c-Jun, anti-c-Fos and anti-C23 antibodies.

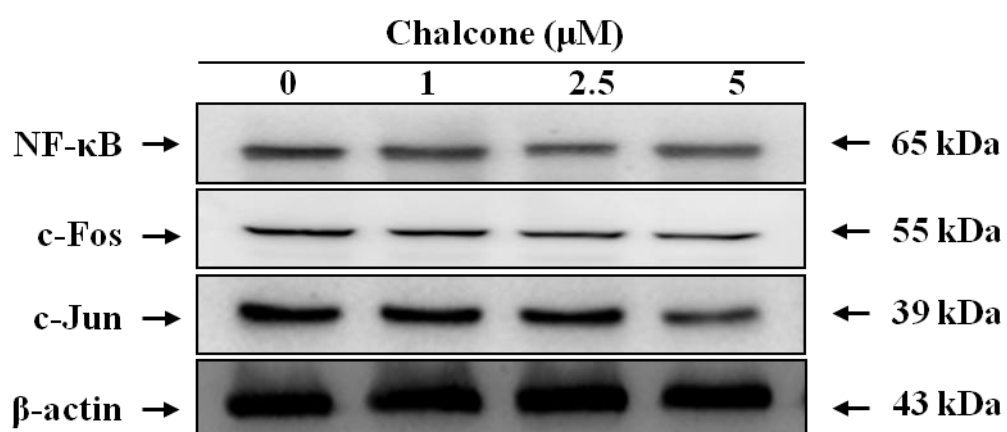
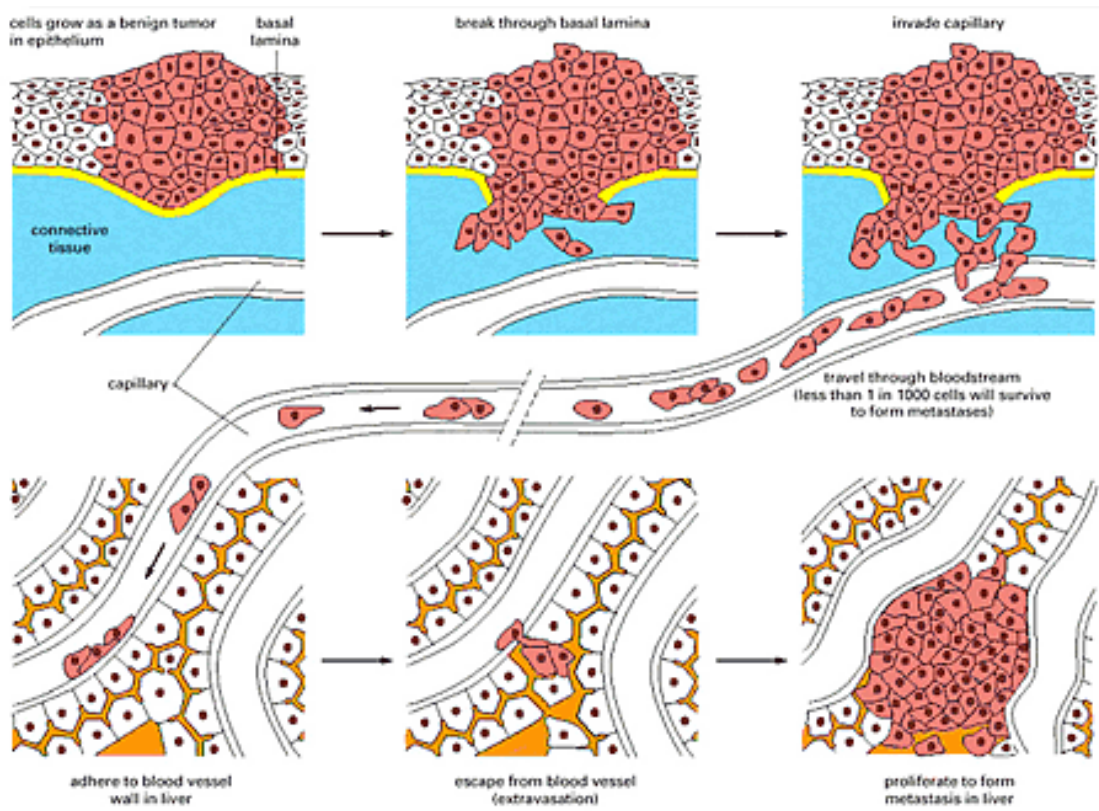


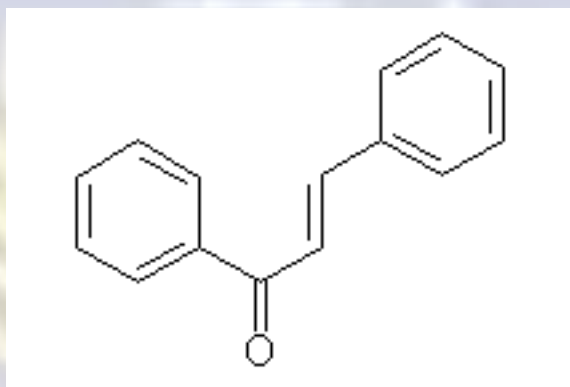
Fig. 14. Effects of chalcone on the protein expression level of NF- κ B, c-Fos and c-Jun expression. T24 cells were treated with with 0, 1, 2.5 and 5 μ M of chalcone for 24 h. The expression of NF- κ B, c-Fos and c-Jun were analyzed by Western blotting. β -actin as an internal control.

第十章 附圖表



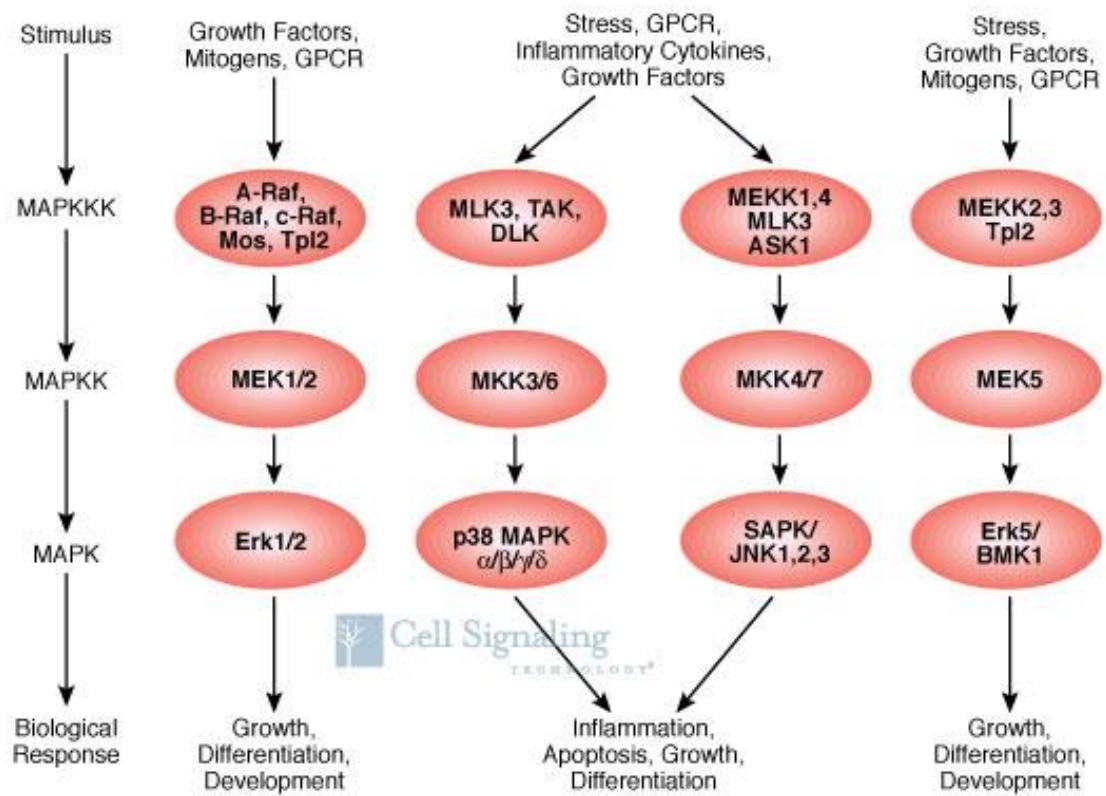
附圖一、癌細胞侵襲和轉移的過程

Alberts, B. (Bruce Alberts) et al. Molecular Biology of the Cell ,4th ed., New York: Garland, 2002, p. 1325



附圖二、Chemical structure of chalcone form *Angelica keiskei* koidzumi

<http://www.extrasynthese.com/products-catalog/flavonoids/chalcone-p2029342-c1041.html>



附圖三、Mitogen-activated protein kinase pathway (MAPK) family

附表一、引子序列與 annealing 溫度

Enzyme	Sequence 5'→3'	Temp (°C)
MMP-2	5'-GGCCCTGTCACTCCTGAGAT-3' 5'-GGCATCCAGGTTATCGGGGA-3'	50°C
MMP-9	5'-CAACATCACCTATTGGATCC-3' 5'-CGGGTGTAGAGTCTCTCGCT-3'	50°C
u-PA	5'-TTGCGGCCATCTACAGGAG-3' 5'-ACTGGGGATCGTTATACATC-3'	55°C
β-actin	5'-TCGTGCGTGACATTAAGGAG-3' 5'-AGTACTTGCGCTCAGGAGGA-3'	50°C